

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
CARRERA DE INGENIERIA AGRONOMICA**



**TESIS DE GRADO**

**"EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE LA SEMILLA EN  
LA REPRODUCCIÓN DE LA ESTEVIA (*Stevia rebaudiana Bert.*)"**

**WILFREDO VALLE MAMANI**

**La Paz, Bolivia  
2005**

**Universidad Mayor de San Andrés**  
**Facultad de Agronomía**  
**Carrera de Ingeniería Agronómica**

**EFFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE LA SEMILLA EN  
LA REPRODUCCIÓN DE LA ESTEVIA (*Stevia rebaudiana Bert.*)**

*Tesis de Grado presentado como requisito  
parcial para optar el Título de  
Ingeniero Agrónomo*

**WILFREDO VALLE MAMANI**

**Tutor (es)**

Ing. Agr. José Luis Mantilla Gemio .....

**Asesores:**

Ing. Agr. Ramiro Mendoza Nogales .....

**Comité Revisor:**

Ing. Agr. Félix Rojas Ponce .....

Ing. Agr. Hugo Mendieta Pedrazas .....

Ing. Agr. Jorge Cusicanqui Giles .....

**APROBADA**

**Decano:**

Ing. M.Sc. Jorge Pascuali Cabrera .....



El presente trabajo esta dedicado :

Al divino creador por permitirme la existencia.

A mi mamá Porfidia y mi papá Arsenio  
quienes me enseñaron a no ahorrar la vida en estéril  
egoísmo,  
a no ser solo un arsenal de palabras.

A mis hermanas Susana, Patricia y Maria Teresa con  
quienes juntos esculpimos sueños e ideales.

A mi abuelita Maria por su apoyo incondicional.

A Milena que sin su ayuda nada de esto hubiese  
sido posible.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Ing. Ramiro Mendoza por su asesoramiento profesional y personal, por la paciencia y comprensión brindada a lo largo de la realización del presente trabajo de tesis.

Al Ing. José Luis Mantilla, por su apoyo moral y sobre todo por la amistad brindada, sin el cual difícilmente hubiera sido posible la realización del presente trabajo.

Al Instituto Superior Tecnológico Agro – Industrial Caranavi (ISTAIC) por haber brindado sus instalaciones para la realización del presente trabajo, en especial a los Ingenieros: Casto Maldonado, Gregorio Zapata y Jorge Barco.

A la Oficina regional de Semillas La Paz, por brindar sus instalaciones y equipos para la realización del trabajo de investigación en la fase de laboratorio en especial a los ingenieros: Yesmy Laredo y Jorge Valdivia.

A los Ingenieros :Félix Rojas, Hugo Mendieta y Jorge Cusicanqui, por las sugerencias, observaciones y sobre todo por la paciencia brindada en la revisión del trabajo.

A los agricultores: Moisés Tancara, Esteban Villegas y al Pastor Casimiro Aruni por su amistad y la colaboración prestada siempre de manera espontánea.

Agradecimiento especial a los técnicos del ISTAIC, Gregorio, Severo, Pablo, Zenón y don Nilo por la colaboración prestada siempre de manera muy oportuna.

A los alumnos del ISTAIC, por hacerme sentir como en casa siempre, en especial a Emilio, Raymunda, Oscar y Zulema.

A mi querida facultad a sus autoridades, docentes y administrativos por las enseñanzas y valores impartidos, en especial a la señora Gabriela Vargas por su colaboración en los tramites para la defensa que hicieron que este día por fin llegara.

A mis compañeros de tesis, con quienes compartimos alegrías y también sinsabores a Milena, Edith, Magdalena, Mariano y Juan.

A mis amigos : Rosario Ticona, Gladis Ochoa, Zulema Gutiérrez, Norah Humerez, Jesús Quispe, Víctor Sánchez, Carlos Laruta, Mirco Peñaranda, Rubén Mendoza, Rene Cadena, Daniel Poroma, Ruy Paco, Wilfredo Blanco, Wilfredo Gutiérrez, Ledesmo Aduviri, Alex Anagua, Osvaldo Limachi, Ramiro Huanca y Gonzalo Choque por la amistad brindada.

A mi Mamá Porfidia y mi Papá Arsenio y mis hermanas Susana, Patricia y Maria por haber contribuido en mi formación personal y profesional. A mi abuelita Maria, a mis tíos Miguel, Martín, Juana, Octavio y Toribio por su incesante apoyo. A mis primos Julio, Iram, Dylan, Juan Carlos, José Miguel.

Y a todas aquellas personas que han colaborado de una y otra manera con la realización del presente estudio.

# INDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE GENERAL	iii
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE CUADROS	x
INDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xii

Capitulo	Pagina
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Justificación</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Objetivos</b>	<b>3</b>
1.2.1    Objetivo general	3
1.2.2    Objetivos específicos	3
1.2.3    Hipótesis estadísticas	4
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Origen</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Importancia económica</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Clasificación taxonómica</b>	<b>6</b>
<b>2.4 Usos y propiedades</b>	<b>6</b>
<b>2.5 Características botánicas de la estevia</b>	<b>7</b>
<b>2.6 Ecología del cultivo</b>	<b>8</b>
2.6.1    Clima	8
2.6.2    Suelo	9
2.6.3    Altitud	10
<b>2.7 Métodos de propagación</b>	<b>10</b>
2.7.1    Propagación sexual	10
2.7.1.1  Experiencia en la propagación por semilla	10
2.7.2    Propagación asexual	11
<b>2.8 Almacenamiento de semilla</b>	<b>11</b>
2.8.1    Almacenes abiertos sin control de Humedad o de Temperatura	12

<b>2.9</b>	<b>Envejecimiento de semilla</b>	<b>12</b>
<b>2.10</b>	<b>Deterioro de semillas</b>	<b>12</b>
<b>2.11</b>	<b>Atributos físico biológicos de la semilla</b>	<b>13</b>
2.11.1	Atributos físicos	13
	2.11.1.1 Pureza física	13
	2.11.1.2 Peso de la semilla	14
	2.11.1.3 Porcentaje de humedad	14
2.11.2	Atributos fisiológicos	16
	2.11.2.1 Viabilidad	16
	2.11.2.2 Germinación	16
	2.11.2.3 Relación entre deterioro y germinación	17
	2.11.2.4 Vigor	17
<b>2.12</b>	<b>Técnicas de propagación</b>	<b>18</b>
2.12.1	Cultivo en semillero	18
2.12.2	Método de transplante	19
2.12.3	Edad del transplante	19
2.12.4	El shock del transplante	19
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Localización</b>	<b>20</b>
3.1.1	Ubicación geográfica	20
	3.1.1.1 Características agroclimáticas	22
<b>3.2</b>	<b>Materiales</b>	<b>22</b>
3.2.1	Material vegetal	22
3.2.2	Material de laboratorio	23
	3.2.2.1 Aparatos de laboratorio	23
3.2.3	Materiales de campo	23

<b>3.3</b>	<b>Metodología</b>	<b>23</b>
3.3.1	Pruebas de laboratorio	23
3.3.1.1	Planteamiento del ensayo	24
3.3.1.1.1	Caracterización físico biológica de la semilla	24
3.3.1.1.2	Prueba de germinación	29
3.3.1.2	Desarrollo del ensayo	32
3.3.2	Pruebas en almacigo	34
3.3.2.1	Planteamiento del ensayo	34
3.3.2.2	Desarrollo del ensayo	38
3.3.3	Pruebas de campo	39
3.3.3.1	Planteamiento del ensayo	39
3.3.3.2	Desarrollo del ensayo	44
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Laboratorio</b>	<b>46</b>
4.1.1	Caracterización físico biológica de la semilla	46
4.1.1.1	Análisis de pureza	46
4.1.1.2	Peso de 1000 semillas	47
4.1.1.3	Contenido de humedad	48
4.1.1.4	Prueba de viabilidad	50
4.1.1.5	Prueba de germinación	53
4.1.1.6	Relación viabilidad y germinación	56
4.1.1.7	Relación deterioro y germinación	57
4.1.1.8	Prueba de vigor	58
4.1.2	Prueba de germinación	60
4.1.2.1	Análisis de varianza de las variables de respuesta	60
4.1.2.2	Ensayo de germinación	60
4.1.2.2.1	Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla	61

4.1.2.3	Tasa de germinación	63
4.1.2.3.1	Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla	64
<b>4.2</b>	<b>Almacigo</b>	<b>66</b>
4.2.1	Análisis de varianza de las variables de respuesta	66
4.2.2	Porcentaje de germinación	66
4.2.2.1	Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla	67
4.2.3	Tasa de germinación	69
4.2.3.1	Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla	70
4.2.4	Longitud de radícula	71
4.2.4.1	Discriminación de medias entre tiempos almacenamiento de la semilla	72
4.2.5	Longitud de plúmula	74
4.2.5.1	Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla	74
4.2.6	Altura de plántula 35 días después de la siembra	75
4.2.6.1	Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla	76
4.2.7	Número de plántulas	77
4.2.7.1	Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla	77
<b>4.3</b>	<b>Campo</b>	<b>79</b>
4.3.1	Determinación de los estados fisiológicos en el momento del transplante	79
4.3.2	Análisis de varianza de las variables de respuesta	80

4.3.3	Porcentaje de prendimiento	81
4.3.3.1	Discriminación de medias entre estados fisiológicos en el momento del trasplante	81
4.3.3.2	Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla	83
4.3.4	Altura de planta	84
4.3.4.1	Discriminación de medias entre estados fisiológicos en el momento del trasplante	85
4.3.4.2	Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla	86
4.3.5	Diámetro de tallo	87
4.3.5.1	Discriminación de medias entre estados fisiológicos en el momento del trasplante	88
4.3.5.2	Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla	90
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>92</b>
5.1	Conclusiones generales	92
5.2	Laboratorio	92
5.2.1	Caracterización físico biológica de la semilla	92
5.2.2	Prueba de germinación	93
5.3	Almacigo	94
5.4	Campo	95
<b>6.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>96</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>98</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>106</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Pagina</b>
1	Mapa de localización de la provincia Caranavi	22
2	Croquis del ensayo en Vivero (almacigo)	36
3	Croquis del ensayo en campo	42
4	Efecto del tiempo de almacenamiento en la viabilidad de la semilla	51
5	Efecto del almacenamiento de la semilla en el porcentaje de germinación	54
6	Duración del proceso de germinación por tiempo de almacenamiento de la semilla	55
7	Velocidad de germinación por tiempo de almacenamiento de la semilla	55
8	Análisis de la prueba de viabilidad y germinación por tiempo de almacenamiento de la semilla	57
9	Análisis de la relación deterioro germinación por tiempo de almacenamiento de la semilla	58
10	Efecto del almacenamiento en el vigor de la semilla	59
11	Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la germinación	61
12	Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la tasa de germinación	64
13	Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la germinación	68
14	Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla en el % de germinación en campo y laboratorio	69
15	Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la tasa de germinación	70
16	Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla en la tasa de germinación en campo y laboratorio	71
17	Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la longitud de la radícula	72
18	Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la longitud de la plúmula	75
19	Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la altura de plántula a los 35 DDS	76
20	Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla en el número de plántulas	78
21	Determinación de los estados fisiológicos en el momento del transplante por tiempo de almacenamiento de la semilla	79

22	% de prendimiento para estados fisiológicos en el momento del trasplante	82
23	% de prendimiento para tiempos de almacenamiento de la semilla	83
24	Altura de planta para estados fisiológicos en el momento del trasplante	85
25	Altura de planta para tiempos de almacenamiento de la semilla	86
26	Diámetro de tallo para estados fisiológicos en el momento del trasplante	89
27	Diámetro de tallo para tiempos de almacenamiento de la semilla	90

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Daños en la semilla provocados por el cambio en el contenido de Humedad	17
2	Factores y niveles del ensayo en laboratorio	25
3	Tratamientos del ensayo	25
4	Factores y niveles del ensayo en almacigo	35
5	Tratamientos del ensayo	35
6	Factores y niveles del ensayo en campo	41
7	Tratamientos del ensayo	41
8	Porcentaje de pureza de semillas de estevia	46
9	Análisis del peso de 1000 semillas	47
10	Análisis de la determinación de humedad	48
11	Análisis de la prueba de viabilidad	50
12	Análisis de la prueba de germinación	53
13	Análisis de la prueba de viabilidad y germinación	56
14	Análisis de la relación deterioro y germinación	
57		
15	Cuadrados medios para las variables de respuesta	60
16	Análisis de varianza para efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la de germinación	61
17	Análisis de varianza para efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la tasa de germinación	63
18	Cuadrados medios para las variables de respuesta	66
19	Análisis de varianza para efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la germinación	67
20	Análisis de varianza para efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la tasa de germinación	69
21	Análisis de varianza para efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la longitud de radícula	71
22	Análisis de varianza para efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la longitud de plúmula	74
23	Análisis de varianza para efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la altura de plántula a los 35 DDS	75
24	Análisis de varianza para efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre el número de plántulas	77
25	Cuadrados medios para las variables de respuesta	80
26	Análisis de varianza para el porcentaje de prendimiento	81
27	Análisis de varianza para altura de planta	84
28	Análisis de varianza para el diámetro de tallo	87

## ÍNDICE DE ANEXOS

### Anexo

- 1 Cámara de germinación
- 2 Separador de semillas y materias extrañas para el análisis de pureza
- 3 Peso de lote y muestra para el análisis de pureza
- 4 Tolerancia para la determinación del peso
- 5 Tolerancia para la determinación del contenido de humedad
- 6 Partes de la semilla verdadera de la estevia
- 7 Planilla de resultados para la determinación de la viabilidad
- 8 Descripción de la semilla comercial (fruto) de la estevia
- 9 Método para análisis de germinación
- 10 Valoración de plántulas normales
- 11 Valoración de plántulas anormales
- 12 Planilla de resultados de Porcentaje de germinación
- 13 Resumen planilla de resultados de germinación
- 14 Planilla de resultados de Porcentaje de germinación (campo)
- 15 Resumen planilla de resultados de germinación
- 16 Desviaciones máximas admitidas entre repeticiones del ensayo de germinación.
- 17 Método para análisis de vigor
- 18 Escala de vigor
- 19 Aspecto climáticos
- 20 Huerto semillero de estevia ubicada en la colonia Santa Fe de Caranavi
- 21 Arbusto de estevia en plena diseminación de semilla
- 22 Preparación del sustrato
- 23 Inicio del proceso de germinación
- 24 Plántulas con 6 pares de hojas listas para el transplante en el lugar definitivo
- 25 Plantas establecidas en el lugar definitivo

## RESUMEN

El almacenamiento de las semillas en condiciones adversas es una técnica utilizada para deteriorar la semilla en forma similar a como ocurre en forma natural y sirve para diferenciar la calidad de las semillas.

Utilizando la semilla estevia, se evaluó el efecto de 3 tiempos de almacenamiento en condiciones adversas, sobre : a) El porcentaje y la tasa de germinación en laboratorio; b) El porcentaje, la tasa de germinación y el posterior desarrollo de las plántulas obtenidas, pruebas llevadas a cabo en vivero; c) Con las plántulas obtenidas en vivero, adicionalmente se probó 3 estados fisiológicos en el momento del transplante ( 6, 8 y 10 pares de hojas ), donde se evaluó el porcentaje de prendimiento, altura y diámetro de planta.

Los diseños estadístico utilizados fueron : a) diseño completamente al azar ;b) diseño bloques al azar ; c) diseño de bloques al azar en un arreglo de parcelas divididas.

Las semillas después de cosechadas se almacenaron (a y b) durante 21 ,42 y 63 días. Para el inicio de las pruebas las semillas fueron retiradas a los 21 , 42 y 63 días del lugar de almacenamiento respectivamente. Luego de sacarse del almacenamiento, las semillas se colocaron (a) en papel filtro (b) en sustrato de arena y humus que se humedecían diariamente con agua. (c) Las plántulas fueron retirados de la almaciguera cuando alcanzaban los estados fisiológicos de 6 ,8 y 10 pares de hojas.

Con los datos obtenidos, se hizo los análisis de varianzas correspondientes para las variables de respuesta y las diferencias entre medias se detectaron mediante la prueba de Duncan, por medio del paquete estadístico SAS 6.11.

a)El porcentaje de germinación fue afectado por el almacenamiento de la semilla que se redujo de 5.5 % a 3 % a los 21 días, 2 % a los 42 días y finalmente a 0.5 % a los 63 días de almacenamiento de la semilla. La tasa de germinación paso de 0.22 a 0.15 a los 21 días, 0.11 y a 0.03 a los 42 y 63 días de almacenamiento de la semilla.

b) El comportamiento en campo fue similar en cuanto al porcentaje y la tasa de germinación. El porcentaje de germinación disminuyó de 4.25 % a 3.0 % a los 42 días y a 1.75 a los 63 días de almacenamiento de la semilla. La tasa de germinación también disminuyó de 0.23 a 0.14 a los 42 días y a 0.99 a los 63 días de almacenamiento de la semilla. El envejecimiento de la semilla disminuyó la longitud de radícula de 2.36 cm a los 21 días, a 1.02 cm y 0.76 cm a los 42 y 63 días respectivamente. Por otra parte el mayor tiempo de almacenamiento de la semilla (42 y 63 días) disminuyó la longitud de plúmula de 0.71cm a 0.44 cm y 0.43 cm respectivamente. El efecto del almacenamiento de la semilla sobre la altura de las plántulas se observó a los 35 días después de realizada la siembra ( de 1.61 cm a los 42 días a 1.16 cm a los 63 días) y el número de plántulas obtenidas también fue afectado (de 610 plántulas a los 21 días a 422 plántulas y 329 plántulas a los 42 y 63 días de almacenamiento de la semilla ).

c) Por otra parte a mayor edad fisiológica en el momento del transplante (8 y 10 pares de hojas ) disminuyó el porcentaje de prendimiento de 93 % a 86 % y 80 % respectivamente. El envejecimiento de la semilla disminuyó el porcentaje de prendimiento de las plántulas obtenidas de 89 % a los 21 días, a 86 % y 84 % a los 42 y 63 días de almacenamiento respectivamente.

En las plantas se observó una reducción en la altura de estas como efecto del transplante a diferentes edades fisiológicas pero que estadísticamente no fue significativa. El envejecimiento de la semilla tuvo un efecto marcado en la altura de las plantas en el lugar definitivo ( de 27.5 cm a los 42 días a 24.4 cm a los 63 días de almacenamiento de la semilla ).

El diámetro de las plantas fue también afectada por el estado fisiológico en el momento del transplante determinándose una reducción en el diámetro conforme la edad fisiológica aumentaba (de 3.32 cm a los 6 pares de hojas a 3.02 cm y 2.82 cm a los 8 y 10 pares de hojas ). El envejecimiento de la semilla afectó en los diámetros de las plantas obtenidas una vez en el lugar definitivo ( de 2.99 cm a los 42 días a 2.73 cm a los 63 días de almacenamiento).

## 1. INTRODUCCIÓN

La tendencia mundial al consumo de productos con bajo contenido calórico aumentó notablemente en los últimos tiempos. En respuesta a estas necesidades surge el mercado de los edulcorantes no calóricos tanto naturales como sintéticos. Los productos no naturales demostraron ser nocivos y de características cancerígenas como el sorbitol, aspartame, ciclamato.

La estevia (*Stevia rebaudiana Bert.*), es la principal productora del edulcorante natural acalórico cuyo componente principal es el esteviosido, que es 300 veces más dulce que el azúcar de caña.

La estevia se distribuye sin restricción alguna en Japón, Corea, Taiwán, Tailandia, Indonesia, Malasia, China y Filipinas.

En Bolivia la estevia es cultivada en diferentes departamentos : La Paz (Caranavi, Nor y Sud Yungas), Santa Cruz (Yapacani), Cochabamba (Capinota), y Beni (Trinidad), por personas particulares que no disponen de información técnica de sus experiencias. En el municipio de Caranavi el cultivo de la estevia cobra gran importancia, constituyéndose en la actualidad la principal fuente de ingresos para muchas familias.

La demanda creciente del producto a nivel local se hace cada día mas evidente y la escasa oferta existente condiciona a un buen precio del mismo, que hace que cada día mas agricultores hagan de esta actividad suya.

La escasa información acerca del cultivo en temas referentes a semillas, manejo del cultivo, secado etc., en general es una de las limitantes para la adecuada difusión del mismo.

## 1.1. Justificación

En los últimos años los esfuerzos de muchas instituciones gubernamentales y no, se enfocan en buscar cultivos que sustituyan a los tradicionales, en especial al cultivo de la hoja de coca. Fruto de estas iniciativas surge el desarrollo alternativo y con estos una serie de cultivos con buenas perspectivas de implementación en la región y sobre todo con potencial económico, la estevia es uno de estos cultivos.

Las investigaciones acerca de esta planta en la región son limitadas y las existentes han dejado de lado el tema de semillas, olvidando que es la base para el establecimiento de una satisfactoria población de plantas, que es el primer paso crítico en la producción de cultivos y que el fracaso en este primer paso es un riesgo que exige cuidado.

La situación es crítica, ya que en el país muchas semillas son comercializadas con bajos niveles de germinación, lo cual puede ser originado por las condiciones en que se almacenan. El mal manejo de la semilla como material inicial repercute en la calidad agronómica de los trasplantes obtenidos, que posteriormente inciden en la productividad del mismo en campo.

Todas estas dificultades y más aun en un cultivo relativamente nuevo hacen necesario unir esfuerzos para esclarecer ciertos eslabones dentro de la cadena de producción que son ahora una limitante para desarrollar una producción importante y significativa dentro del contexto nacional.

Por todo lo mencionado el presente trabajo de investigación, es presentado tomando en consideración los siguientes aspectos :

- La poca existencia de estudios acerca de la caracterización físico biológica de la semilla, si consideramos que uno de los grandes peligros

en la agricultura, es la utilización de semillas que no tienen la capacidad de producir una abundante cosecha.

- La necesidad de determinar la dinámica de estas características en el tiempo, si consideramos que es práctica usual almacenar las semillas de la última cosecha, muchas veces en condiciones adversas para la futura siembra, obviando muchas veces que la semilla es un ser vivo y que esta expuesta a sufrir variaciones en su calidad, que repercutirán posteriormente en la producción.
- El crecimiento del transplante una vez establecido a campo depende de su edad cronológica y fisiológica aspecto no muy considerado en la implementación de un cultivo y que es de suma importancia para alcanzar el potencial máximo de productividad.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo general**

Determinar el efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla en la reproducción de la estevia (*Stevia rebaudiana Bert.*), en la localidad Caranavi, departamento de La Paz.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Realizar la caracterización físico - biológica de la semilla de estevia (*Stevia rebaudiana Bert.*).
- ✓ Determinar el efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla en la germinación.

- ✓ Determinar el efecto del almacenamiento de la semilla en la propagación en almácigo.
- ✓ Determinar el estado fisiológico óptimo en el momento del transplante.

#### **1.2.3.1 Hipótesis estadísticas**

- ✓ El tiempo de almacenamiento de la semilla no presenta efecto alguno en la germinación.
- ✓ El almacenamiento de la semilla no tiene efecto en la propagación en almácigo.
- ✓ No hay efecto del estado fisiológico en el momento del transplante en el establecimiento en campo.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA**

### **2.1 Origen**

Según Candeira (2002), la planta fue descubierta en el Paraguay por el famoso naturalista Moisés Bertoni, descrita por primera vez en 1899 y estudiada por él en 1905, dando el nombre definitivo a la especie de *Stevia rebaudiana Bertoni*.

Cepex (1982), manifiesta que la mayoría de los estudios admiten que la estevia (Ka'á he'e) es una planta paraguaya, originaria de la región oriental del país, al respecto Jordán (1984), manifiesta que la región donde el cultivo se encuentra ampliamente difundido comprende los departamentos de: Amambay, Concepción, San Pedro, Canendiyú, Alto Paraná y Caaguazú.

### **2.2 Importancia Económica**

La agroindustria de la estevia es una de las actividades agrícolas más rentables considerando entre otros factores, que 1 kg de hoja seca tiene un valor de 3 dólares y 1 kg de esteviósido alcanza cifras alrededor de 120 dólares, en un mercado internacional estimulado y que la relación hoja seca-esteviósido es de 10:1, siendo que pueden ser producidas hasta cerca de 3 toneladas de hojas secas por hectáreas por año (Candeira, 2002).

Pinaya (1996), en su estudio acerca de las densidades de siembra, encontró que en el tratamiento de 100.000 plantas por hectárea, el análisis económico muestra un beneficio neto de 4.211.39 dólares y cuya relación beneficio/costo es 2.41 que indica que por cada unidad monetaria invertida, se tendrá una ganancia de 2.41 unidades monetarias para el primer año, por lo que recomienda la difusión del cultivo.

Pajas (2000), estudió la incorporación de tres niveles de materia orgánica, encontrando que el tercer nivel de materia orgánica(40 toneladas por hectárea) produjo un beneficio neto de 3.981.80 dólares por hectárea, por lo que recomienda intensificar el cultivo de estevia a nivel de finca por que genera ingresos a la familia del agricultor.

### **2.3 Clasificación Sistemática**

Según Cronquist (1981), citado por Pajas (2000), la estevia presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Sub reino : Embryobionta  
División : Magnoliophyta  
Clase : Magnoliopsida  
Orden : Asterales  
Familia : Asteraceae (Compositae)  
Tribu : Eupatorieae  
Género : Stevia  
Especie : Stevia rebaudiana Bert.

### **2.4 Usos y propiedades**

Numerosos estudios realizados principalmente en Japón y Dinamarca, demostraron que la estevia (hierba dulce) es totalmente segura para ser usada como producto alimenticio, además de terapéutico (Angelucci,1986). Una gran diferencia que tiene con los edulcorantes sintéticos es lo siguiente: se mantiene estable a altas temperaturas. Los sintéticos se descomponen y se vuelven tóxicos a la exposición a altas temperaturas.

Pinto (1986), el uso más difundido de la estevia es de edulcorante. Se puede usarla en bebidas tanto como en comidas. Muchos prefieren usar las hojas en su forma natural, y otros prefieren la conveniencia de un concentrado. Japón

donde su uso es muy difundido (tiene el 30% del mercado de edulcorantes), también se le da uso como aromatizante en carnes, pescados y pollos.

Otro uso interesante es en los cosméticos. Los nativos lo usan para la piel, por su alto poder cicatrizante, y en el cabello.

Si bien no hay conclusiones científicas determinantes (debido a la falta de investigaciones en productos naturales), tendría las siguientes propiedades:

- regular los niveles de azúcar en sangre
- Reguladora de la presión arterial – Hipotensora
- Prevenir las caries y enfermedades de encías
- Prevenir enfriamientos y gripes.
- Reemplazar el excesivo consumo de azúcar en los niños
- excelente ayuda para perder peso
- Rica en minerales

## **2.5 Características botánicas de la estevia**

Según Candeira (2002), la estevia es una dicotiledónea perenne cuyo sistema radical es pivotante al inicio de su desarrollo. Después del primer corte se convierte en fasciculado y con mayor distribución en la capa superior del suelo. En su sistema vegetativo, durante el primer ciclo se observa un tallo principal, después del primer corte llegan a rebrotar mayor número de ramificaciones.

Bertonha (1986), señala que las hojas son de forma lanceolada, elíptica u ovaladas, cuyo borde es entero en la parte basal y aserrada en el ápice, de disposición opuesta o en verticilos alternos cuyo tamaño varía de 2 a 10 cm de longitud y de 1 a 3 cm de ancho.

Candeira (2002), indica que la flor es hermafrodita, en capítulos de 5 flores tubulares pequeñas, terminales o axilares agrupados en panículas corimbosas. Una planta tarda más de un mes en producir todas sus flores.

Los frutos son aquenios con 5 vértices intermedios con glándulas idénticas a las encontradas en la corola. El “pappus” tiene de 13 a 15 aristas, el óvulo es de naturaleza anátropa con tegumento único, típico de las Compuestas, siendo que el desarrollo embriológico dura 15 días.

Monteiro (1981), mostró que en la polinización cruzada de la estevia pueden ser formados tres tipos de aquenios : a) aquenio claro estéril: no ocurre la polinización, no existe por tanto embrión ; b) aquenio oscuro fértil: en la que ocurre la fecundación de la oosfera, habiendo la formación de un embrión normal; c) aquenio oscuro estéril : ocurre la polinización, y desenvolvimiento del tubo polínico, pero este tiene un crecimiento interrumpido antes de llegar a la oosfera (posiblemente por una incompatibilidad esporofítica); las paredes del aquenio son de color oscuro, más no posee embrión.

Resultados obtenidos con polinizaciones controladas, indican que la especie posee autoincompatibilidad de tipo esporofítico y formación de embriones pseudogámicos por la polinización cruzada. El número de cromosomas es de  $2n = 22$  (Candeira, 2002).

Los frutos de la estevia son fotoblásticos positivos, esto significa que solo germina en la presencia de luz.

## **2.6 Ecología del cultivo**

### **2.6.1 Clima**

Según Candeira (2002), para el crecimiento ideal de la planta la temperatura media es de 20 °C a 25 °C con una máxima entre 30 °C a 35 °C y una temperatura mínima de 10 °C a 15 °C. Para un buen desarrollo de las raíces las exigencias de las plantas son las mismas. El contenido de esteviósido queda bastante reducido en plantas cultivadas a bajas temperaturas.

Según Candeira (2002), la estevia es una planta de días cortos para la floración, tiene un tiempo crítico de 12 a 13 horas de iluminación. Por su parte Viana (1982), sostiene que plantas sometidas a fotoperíodos de 16 horas aumentaron significativamente el contenido de steviósido en las hojas, llegando al doble.

Por su parte Candeira (2002), menciona que cuando la planta es sometida a condiciones de iluminación de días largos (16 horas de luz) hay un aumento de longitud de los entrenudos, área foliar, materia seca y una reducción de intervalo de tiempo para la aparición de los sucesivos pares de hojas, comparado con plantas sometidas a días cortos de iluminación.

Cardozo (1986), señala que la estevia es un cultivo de clima tropical y sub tropical. Por su parte Pinto (1986), sostiene que la exigencia de humedad es alta y de manera continua; es decir, no se debe dar la falta de agua durante las diferentes etapas de su desarrollo. De ahí que la distribución natural de este cultivo se observa en zonas donde las precipitaciones medias anuales son altas (1.400 a 1.600 mm).

## **2.6.2 Suelo**

Jiménez (1974), afirma que la estevia es una planta rústica, adaptándose a diferentes tipos de suelo, sin embargo es necesario hacer una corrección del ph, a un nivel de 6. Por su parte Pinto(1986), sostiene que debido a las características y exigencias de este cultivo, especialmente en cuanto a la distribución de las raíces dentro del perfil del suelo y a las exigencias tanto nutricional, de humedad y aireación, los suelos ideales para un buen desarrollo del ka'a he'e son aquellos que presentan tanto las propiedades químicas y físicas capaces de responder a dichas exigencias. Los suelos que cumplen con estos requisitos son los conocidos como: franco arcillosos, areno-arcillosos o los arcillo-arenosos (Cañeta,1983).

En cuanto a la topografía, lo ideal es un terreno no muy accidentado, con un porcentaje de pendiente menor a 5% (Pinto,1986).

### **2.6.3 Altitud**

Según Sumida citado por Pinaya (1996), sostiene que la producción al nivel del mar presenta problemas fisiológicos, a raíz de las altas temperaturas, encontrándose mejores respuestas entre altitudes de 300 a 1800 msnm.

## **2.7 Métodos de propagación**

La propagación de plantas consiste en efectuar su multiplicación por medios tanto sexuales como asexuales (Hartmann y Kester 1999).

### **2.7.1 Propagación sexual**

La propagación por semillas es uno de los métodos principales de reproducción de las plantas en la naturaleza y uno de los mas eficientes (Hartmann y Kester 1999). La estevia se reproduce sexualmente por aquenios observándose alta heterogeneidad en las poblaciones resultantes, debido a su polinización cruzada (Marcavillaca *et al.*,1983).

#### **2.7.1.1 Experiencias en la propagación por semilla de estevia**

Experimentos preliminares constataron que la germinación era mayor a 25 °C de temperatura (Felipe, 1971).

Steviaparaguay (2002), afirma que la estevia es conocida por ser de baja germinación, apenas dos a tres por ciento de lo sembrado germina como semillas nuevas.

Jordán (1984), comprobó que la amplitud de germinación oscilaba entre 20 a 80 % seleccionando aquenios frescos a simple vista .

El porcentaje de germinación baja mucho después de cuarenta días, por lo que recomienda la siembra inmediatamente después de realizada la cosecha de la semilla, para asegurar la frescura y el vigor (Steviaparaguay, 2002).

### **2.7.2 Propagación asexual**

Dada la variabilidad genética antes mencionada, que puede ocasionar un cultivo con plantas de características muy disímiles entre si, lo conveniente es la clonación, es decir, la reproducción asexual, a partir de plantas de características deseadas (Jordán,1983).

## **2.8 Almacenamiento de Semilla**

El almacenamiento es la conservación de semillas viables desde que son recolectadas, hasta el momento de su siembra. Los objetivos que se persiguen con el almacenamiento son: conservar la capacidad germinativa; protegerlas de los agentes que provocan daños como: aves, roedores, insectos y hongos.

Los factores que más influyen en el período de almacenamiento de las semillas son su contenido de humedad y la temperatura de almacenamiento (Aguilera y Goldbach,1980). En base a su contenido de humedad se reconocen dos grandes grupos: ortodoxas y recalcitrantes(Peñaloza,2001).

Las semillas ortodoxas son aquellas cuyo contenido de humedad es posible bajarlo a valores entre 5 a 10 % y guardarlas a temperaturas bajo cero sin dañarlas , y por lo tanto es posible su conservación por periodos largos sin perder su capacidad germinativa. Esta capacidad para tolerar la desecación se debe principalmente a que por el proceso normal de maduración, estas semillas van perdiendo humedad y es así que cuando son dispersadas o bien cuando aun permanecen en el, estando maduras, su contenido de humedad es bajo.

Al segundo grupo pertenecen las semillas que no se pueden secar hasta llegar a bajos contenidos de humedad ya que pierden viabilidad, llegando al estado de madurez con altos contenidos de humedad. Por lo tanto su almacenamiento es factible solo por cortos períodos (Hartmann y Kester 1999).

### **2.8.1 Almacenes abiertos sin control de Humedad o de Temperatura**

Muchas clases de semillas, se almacenan, en graneros, sacos y otros recipientes. En esas condiciones, la longevidad de las semillas depende de la humedad relativa y de la temperatura de la atmósfera del almacén, aunque también depende de la especie de semilla y de sus condiciones al empezar el almacenamiento. En consecuencia, la retención de viabilidad varía con los factores climatológicos de la zona en que se almacenan. Las condiciones más malas se encuentran en climas cálidos - húmedos y las mejores, en regiones frías secas (Hartmann y Kester 1999).

### **2.9 Envejecimiento de la semilla**

El almacenamiento de las semillas bajo condiciones adversas ocasiona el envejecimiento de las mismas (Bewley y Black, 1994). El cambio fisiológico o envejecimiento, varía con la especie de semilla y las condiciones ambientales de almacenamiento principalmente temperatura y humedad (Hartmann y Kester 1999).

El almacenamiento prolongado por períodos superiores a los que tolera una especie en particular incide sobre la calidad de dichas semillas, lo cual se expresa en el porcentaje de germinación y en las plántulas que origina (Peñaloza, 2001).

### **2.10 Deterioro de las semillas**

Según Peñaloza (2001), deterioro es el proceso de envejecimiento y muerte de las semillas. Leskovar (2001), determina el deterioro de semillas como un

complejo de cambios que ocurren con el pasar del tiempo, causando perjuicios a sistemas y funciones vitales, resultando en la disminución en el grado de la capacidad de desempeño de la semilla.

El deterioro empieza después de que la semilla alcanza la maduración fisiológica y continua hasta perder su capacidad de germinar. La duración del proceso de deterioro es determinada principalmente por la interacción entre herencia genética su contenido de humedad y la temperatura (Hartmann y Kester 1999).

## **2.11 Atributos físico biológicos de la semilla**

### **2.11.1 Atributos físicos**

#### **2.11.1.1 Pureza Física**

Las muestras de semillas de árboles y arbustos pueden contener impurezas como semillas de malas hierbas, semillas de otras especies, estructuras seminales separadas, partículas de hojas y otros materiales. El análisis de pureza tiene por finalidad determinar la composición, en peso, de la muestra que es objeto del ensayo. Para ello se separa la muestra en las partes que la componen. El análisis de pureza es el primer ensayo que debe realizarse, pues los ensayos posteriores se efectúan sobre el componente de semilla pura (Willan, 1991).

Aguirre (1992), sostiene que la determinación de la pureza física de un lote de semillas persigue tres objetivos i) establecer la presencia de malezas nocivas o permitidas para decidir, de acuerdo con el grado de contaminación, si se recibe o no al lote ii) determinar la pérdida debida a la remoción de los materiales contaminantes iii) definir equipos que se utilizarán para el beneficiado de las semillas.

La pureza es el porcentaje en peso de “semillas puras” presentes en la muestra. La designación semilla pura se refiere a la especie, cultivar o tipo de semilla que está presente en forma principal en el lote. Después que se ha pesado la muestra de trabajo, se divide visualmente en : (a) la semilla pura de la clase en consideración; (b) semillas de otros cultivos, (c) semillas de malezas,(d) material inerte, incluyendo estructuras de tipo semilla, semillas vanas o quebradas, cascabillo, tierra, piedras y otras basuras (Hartmann y Kester,1999).

#### **2.11.1.2 Peso de la Semilla**

Trujillo (1997), señala que el peso de la semilla se mide en el componente de semilla pura que se ha separado mediante el ensayo de pureza. Se expresa normalmente como el peso de mil semillas puras. El peso puede determinarse sencillamente contando mil semillas y pesándolas, sin embargo la utilización de varias muestras más pequeñas permite al analista estimar la variación que existe dentro de la muestra.

Bonifacio y Espíndola (1996), indican que el peso de mil semillas es una característica utilizada para informar el tamaño y el peso de la semilla, conociendo el peso de mil semillas, y por consiguiente, el número de semillas por kilogramo, será fácil determinar el peso de semillas a ser utilizado por área para la siembra.

#### **2.11.1.3 Porcentaje de Humedad**

De Acosta (1997), señala que el contenido de humedad esta dado por la cantidad de agua libre que tenga involucrada y es tan vulnerable o cambiante como variaciones presentes en la atmósfera que le permitirá ganar o perder agua continuamente. En laboratorio, el control del contenido de humedad

cuando no se realiza como prueba rutinaria, es de gran utilidad y aplicable a las semillas que van a ser almacenadas.

Aguirre (1992), menciona que el contenido de humedad de las semillas se determina principalmente por dos motivos i) para saber si es necesario secarla ii) para poder calcular descuentos o bonificaciones por alta o baja humedad al momento de calcular la cantidad de semilla recibida.

La gran relevancia de la humedad en el manejo de las semillas radica en que es el factor más importante en la conservación de las semillas, favoreciendo el desarrollo de insectos y hongos, así como su efecto sobre los procesos fisiológicos de las semillas, de los que dependen la pérdida de vigor y viabilidad (Moreno, 1984).

El contenido de humedad en la semilla se convierte en problema para el mantenimiento de la viabilidad por las razones que se resumen a continuación:

**Cuadro 1. Daños en la semilla provocados por el cambio en el contenido de humedad**

<b>Contenido de humedad (%)</b>	<b>Daño Potencial</b>
Menos del 5 %	Auto oxidación de lípidos.
Entre 6 y 10 %	Rango aceptable, o ideal (comprobado) para muchas de las especies ortodoxas.
Entre 10 y 18 %	Se favorece el crecimiento de hongos e insectos.
Entre 18 y 30 %	Hay un incremento en el gradiente de respiración . Descomposición de glucosa y proteína por incremento de la fermentación y actividad bacteriana.
Mas de 45 – 60 %	Se inicia la germinación.

Fuente: Harrington Cit. Bonner. FT 1981 citado por De Acosta (1997).

## **2.11.2 Atributos fisiológicos**

### **2.11.2.1 Viabilidad**

La viabilidad de las semillas es el período de tiempo durante el cual las semillas conservan su capacidad para germinar. Es un período variable y depende del tipo de semilla y de las condiciones de almacenamiento.

Leskovar (2001), se refiere a la capacidad de una semilla de germinar en condiciones óptimas y determina el potencial verdadero de germinación en laboratorio.

ISTA (1976), el objeto del ensayo bioquímico es:

- a) Determinar rápidamente la viabilidad de las muestras de semillas de especies que germinan con lentitud o que presentan latencia.
- b) Determinar la viabilidad de una muestra de trabajo o de semillas individuales latentes en el caso de muestras específicas que al final del ensayo de germinación revelen un alto porcentaje de semillas latentes.

### **2.11.2.2 Germinación**

La germinación consiste en tres procesos parcialmente simultáneos(Dulfus, 1980):

- Absorción de agua principalmente por imbibición, que hace que la semilla se hinche y acabe abriéndose la cubierta seminal.
- Actividad enzimática e incremento de la tasa de respiración y asimilación, que indican la utilización de alimento almacenado y su transposición a las zonas en crecimiento.

- Engrandecimiento y divisiones celulares que tienen como consecuencia la aparición de la radícula y la plúmula .

Moreno (1984), sostiene a la germinación como la emergencia y desarrollo de aquellas estructuras esenciales que provienen del embrión y que manifiestan la capacidad de la semilla para producir una planta normal bajo condiciones favorables.

Leskovar (2001), sostiene que el proceso de germinación comienza con la imbibición y termina con la expansión del eje embrionario.

Hartmann y Kester (1999), sostienen que la germinación se mide con dos parámetros : el porcentaje de germinación y la tasa de germinación. Esas medidas pueden indicar vigor, pero también hay que considerar la tasa de crecimiento de las plántulas y su aspecto morfológico.

### **2.11.2.3 Relación entre deterioro y germinación**

Los aspectos más importantes de la relación entre deterioro de semillas y la germinación puede ser declarado simplemente como: la pérdida de la capacidad de germinación, que es la consecuencia o el efecto final práctico del deterioro; es la última cosa que ocurre en el proceso de deterioro. Además existen consecuencias o efectos menores del deterioro, ellos afectan significativamente el valor de las semillas para la siembra (Leskovar ,2001).

### **2.11.2.4 Vigor**

El vigor de las semillas está determinada principalmente por la germinación y el establecimiento de las plántulas en el campo. De ahí el interés por evaluar ese parámetro de calidad mediante pruebas cuyos resultados estén altamente

correlacionados con el comportamiento de las semillas en el campo (Moreno,1984).

Aldhos (1972), señala que la velocidad de germinación, es una medida del proceso de germinación, por ello se supone que también es del vigor de la semilla y del germen que produce . El interés se basa en la teoría de que probablemente sólo las semillas que germinan con rapidez y vigor en las condiciones favorables del laboratorio serán capaces de producir plántulas vigorosas en las condiciones que existen sobre el terreno, donde una generación débil o retrasada suele tener consecuencias fatales.

Leskovar (2001), manifiesta que el vigor distingue los mejores lotes de semillas, aquellos que tienen una germinación rápida, uniforme y que pueden producir una plántula normal en un rango amplio de condiciones ambientales. Una semilla puede germinar bien, pero carecer de fuerza suficiente para penetrar en el suelo a través de capas duras, o en el caso de que la radícula emerja hacia arriba y no tenga la capacidad para crecer dentro del suelo.

## **2.12 Técnicas de propagación**

### **2.12.1 Cultivo en semillero**

La importancia del semillero como industria auxiliar y eslabón inicial de la cadena de producción hortícola intensiva, hace imprescindible un mejor conocimiento de los factores que regulan el crecimiento de las plántulas en comunidades extremadamente densas que no permitan utilizar técnicas de acondicionamiento, aclimatación o endurecimiento que sean, no solos eficaces en la regulación del crecimiento, sino que presenten efectos claros y predecibles cuando estas plántulas se instalen en el lugar definitivo(Guzmán, 2002).

Las semillas se plantan relativamente cerca entre si en semilleros, a veces elevados del terreno por lo común de alrededor de 1 m de ancho y de diversas longitudes. Allí las plántulas permanecen un tiempo y luego se sacan para transplantarlas a un sitio permanente (Hartmann y Kester,1999).

### **2.12.2 Método de transplante (almaciguera)**

Hartmann (1990), menciona que el transplante es el traslado de las plántulas germinadas en una almaciguera al lugar definitivo de crecimiento, el proceso de transplante es muy delicado ya que de el depende el crecimiento de las plantas hasta la cosecha.

La tecnología del transplante se ha impuesto en los últimos 20 años, la mayoría de los cultivos son aptos para transplantar. Las ventajas del transplante sobre la siembra directa incluyen menor uso en la cantidad de semillas, permite el uso de especies con dificultad en la germinación o donde el periodo de crecimiento es corto, uniformidad en el crecimiento, superior tolerancia a estreses biológicos que afectan el sistema radical y vascular, floración temprana y precocidad de la producción (Hoyos, 1996).

### **2.12.3 Edad del transplante**

El crecimiento del transplante una vez establecido a campo depende de su edad cronológica y fisiológica. Debido a los diferentes medios ambientales y culturales es difícil generalizar acerca de la edad ideal del transplante (Leskovar, 2001).

### **2.12.4 El Shock del transplante**

La capacidad de un transplante a superar el shock depende de cómo las plántulas soportan los cambios estructurales y funcionales de la raíz, de la

capacidad radicular de absorción de agua y nutrientes, de la capacidad de regeneración de nuevas raíces. El objetivo es que el transplante sea capaz de continuar rápidamente su crecimiento radicular y disminuir el lapso de tiempo expuesto al “transplant shock” para retomar su crecimiento vegetativo, y así poder alcanzar el potencial máximo de productividad(Guzmán, 2002).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Localización**

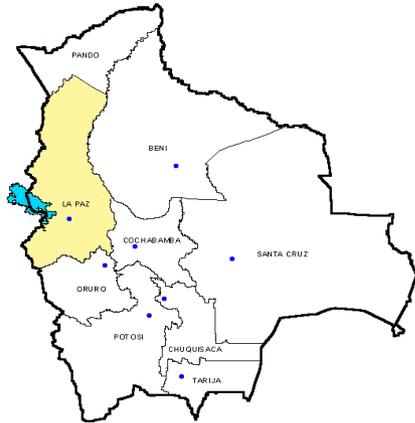
Para la implementación del ensayo se eligió la colonia Broncini, que cuenta con características climáticas similares a los del lugar de origen del cultivo y en la zona se cuenta con pequeñas parcelas del cultivo que facilitaron el poder acceder al material vegetal y recoger experiencias de los agricultores dedicados a esta actividad.

En la colonia se encuentra los predios del Instituto Superior Tecnológico Agro Industrial Caranavi (ISTAIC) institución que facilitó los espacios experimentales para la realización del trabajo, además de contar con una estación meteorológica próxima al área de investigación

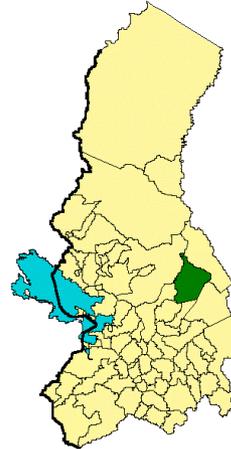
##### **3.1.1 Ubicación geográfica**

El ensayo se estableció en el departamento de La Paz, Provincia Caranavi, cantón Caranavi, colonia Broncini. Geográficamente se encuentra situada a una longitud  $67^{\circ} 33^{\circ}$  oeste y una latitud  $15^{\circ} 49^{\circ}$  sur, con una altitud de 600 msnm. (SENAMHI, 2001).

BOLIVIA  
Ubicación del Departamento



LA PAZ  
Ubicación de la Provincia



MAPA DE CARANAVI



Fuente: Atlas estadístico de Municipios (UDAPE)  
**Figura 1. Mapa de Localización de la Provincia Caranavi**

### **3.1.1.1 Características agroclimáticas**

El clima de la localidad de Caranavi y su entorno corresponde en general a los regímenes subtropicales y tropicales, presentando una variación climática por las grandes diferencias geomorfológicas y altitudinales. Dentro de la clasificación por pisos ecológicos la localidad de Caranavi esta formada por serranías medias con cimas amplias, los suelos son de color pardo amarillo oscuro, con rasgos de erosión, deslizamientos, lavado de nutrientes; son suelos ácidos de relativa fertilidad, donde se cultivan café, bananos, cítricos, maíz y arroz, también existe la crianza de aves de corral y ganado menor; presenta suelos poco profundos sin buen drenaje, moderada fertilidad, con textura franco arcillosa, con porcentaje de grava y piedra de 5 a 15 % en los horizontes superiores y de 15 a 80 % en los horizontes inferiores (PDM – Caranavi, 2001).

De acuerdo a los datos registrados promedios desde la gestión agrícola 1995 a 1999, la temperatura media anual registrada en la localidad de Caranavi alcanzó a 21.9 ° C ( variable según el año ), registrándose temperaturas bajas en la estación de invierno, en los meses de junio, julio y agosto. La precipitación pluvial media anual de 1458 mm, donde la precipitación registradas con mas intensidad están entre los meses de enero y febrero con 232.9 y 217.8 mm/mes, variable en función a los años lluviosos ( PDM – 2001 y SENAMHI, 2001).

## **3.2 Materiales**

### **3.2.1 Material vegetal**

El material vegetal que se utilizó para el presente trabajo fueron semillas de estevia, procedente de la colonia Santa fe de Caranavi.

### **3.2.2 Material de laboratorio**

Cajas petri, papel filtro, pinzas, lupas, crisoles, agua destilada, tetrazolio (cloruro 2,3,5 – trifenil tetrazolio ).

#### **3.2.2.1 Aparatos de laboratorio**

Balanza de precisión, luz reflejada, cámara de germinación, desecador, estufa eléctrica, estereoscopio, microscopio.

### **3.2.3 Materiales de campo**

Para el trabajo de campo se utilizaron: estacas, letreros, marbetes, hilos, termómetros, pluviómetros, huincha, flexómetros, reglas, vernier, martillos, azadones, machetes, bolsas de papel, libretas de campo y planillas.

## **3.3 Metodología**

La metodología se dividió en tres fases:

### **3.3.1 Pruebas de laboratorio**

La primera fase de la investigación se realizó en laboratorio y se dividió en dos partes que a continuación se detallan :

- a) La primera parte correspondió a la determinación de las características físico biológicas de la semilla, análisis realizado basado en las reglas del ISTA, detallada ampliamente en el punto de las variables de respuesta.

- b) La segunda parte que correspondió a la determinación del efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla en la germinación.

### **3.3.1.1 Planteamiento del ensayo**

#### **3.3.1.1.1 Caracterización físico biológica de la semilla**

##### **a) Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos de la caracterización, para las características particulares del estudio se empleo estadística simple o descriptiva (Steel y Torrie,1996).

##### **b) Variables de respuesta**

- **Determinación de la muestra de trabajo**

Debido a que no se contaban con datos establecidos para el análisis de pureza, para la especie se contaron 2500 semillas con tres repeticiones como establece el ISTA (1976).

- **Pureza física**

Se peso la muestra de trabajo y se clasifico como semilla pura como prescribe el ISTA (1976), para la familia *Compositae* a :

- Aquenios, con o sin “pappus”, a menos que fuera evidente que no contengan semilla.
- Fragmento de aquenio cuyo tamaño sea superior a la mitad de su tamaño inicial a menos que fuera evidente que no contengan semilla.

- Semilla con el pericarpio (cubierta frutal), parcial o totalmente desprendido.
- Fragmento de semilla cuyo tamaño fuera superior de su tamaño inicial, con el pericarpio parcial o totalmente desprendido.

Una vez seleccionada la semilla pura se procedió a pesar en una balanza analítica. El porcentaje de semilla pura se obtuvo con la siguiente formula (Willan, 1991) :

$$\text{Porcentaje de pureza} = \frac{\text{Peso de la semilla pura}}{\text{Peso total de la muestra original}} \times 100$$

- **Determinación del peso**

La determinación del peso de semilla se realizó mediante el conteo de 100 semillas en ocho repeticiones y su posterior pesaje en la balanza analítica, con las que se calculo la media, desviación típica y el coeficiente de variación, teniendo la precaución de que el coeficiente de variación sea inferior a cuatro como establece el ISTA, (1996).

- **Determinación del contenido de humedad**

Luego de realizada la cosecha se introdujo semilla de los arbustos en frascos de vidrio herméticamente cerrados para evitar que la semilla gane o pierda humedad y los resultados de cantidad de humedad sean lo más fidedignos posible.

La determinación se realizó con 2 muestras de 1 gramo en cajas petri. Una vez que se peso la semilla en la caja petri, esta se destapo y se introdujo a la estufa calibrada a 105 grados centígrados durante 17 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de secado, las cajas se taparon y rápidamente se colocaron al desecador durante 30 minutos, para que se enfríen y puedan

ser pesadas sin ganar humedad y finalmente se peso las muestras en una balanza con sensibilidad de cuatro decimales, el contenido de humedad se calculo mediante la siguiente formula (Moreno, 1984) :

$$\frac{M_2 - M_3}{M_2 - M_1} \times 100$$

Donde :

$M_1$  = Peso en gramos de la caja y su tapa.

$M_2$  = Peso en gramos de la caja, tapa y semilla antes del secado.

$M_3$  = Peso en gramos de la caja, tapa y semilla después del secado en la estufa.

- **Ensayo para la determinación de la viabilidad**

La determinación de la viabilidad se realizó para cada tiempo de almacenamiento de la semilla. El ensayo se efectuó sobre tres repeticiones de 100 semillas cada una, tomadas al azar de la fracción de semilla pura del análisis de pureza. Para tal efecto se empleo una solución acuosa al 0.5 % de bromuro de tetrazolio.

Las semillas previamente fueron preparadas para facilitar la penetración con el remojado por lapso de 12 horas en agua a una temperatura de 28 °C y punciones con la ayuda de una aguja histológica en la parte superior del fruto donde nacen las aristas.

Las semillas preparadas se sumergieron completamente en la solución del tetrazolio y se llevo a la cámara de germinación durante 5 horas a una temperatura de 28 °C en la oscuridad. Al final de este periodo se procedió a decantar la solución. Después las semillas tratadas se colocaron sobre una placa y se mantuvieron húmedas durante la valoración .

Esta prueba bioquímica para determinar la viabilidad es un proceso de reducción del cloruro o bromuro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio el cual produce, en las células vivas de la semilla una sustancia roja estable y no difundible, la triefenil-formazan. Esto hace posible distinguir entre las partes vivas y las muertas en una semilla. Además de las células viables completamente teñidas, o de las células muertas sin teñir, se pueden presentar semillas parcialmente teñidas. La proporción de las áreas necróticas en el embrión y/o en el endospermo, determinan si la semilla se clasifica como viable o no viable (ISTA, 1976).

- **Ensayo de germinación**

La determinación del porcentaje de germinación se realizó para cada tiempo de almacenamiento. Los ensayos de germinación se efectuaron con semillas de la fracción de semilla pura procedente del análisis de pureza.

La semilla pura se mezcló bien y se contaron 400 semillas en repeticiones de 100 contadas aleatoriamente, distribuidas uniformemente en contacto con el papel filtro humedecido llevados posteriormente a la cámara de germinación a una temperatura de 28 ° C por un lapso de 10 días.

Para determinar el porcentaje de germinación (PG): se realizaron observaciones diarias a partir del día 3 después de la siembra, momento en la cual fue observada la emergencia de las plántulas mediante contajes realizados diariamente durante 10 días. Para lograr uniformidad en la valoración de las plántulas normales deben estar de acuerdo con una de las siguientes definiciones:

- a) Plántulas que manifiestan la capacidad para continuar su desarrollo hacia plantas normales, cuando crecen en suelo de buena calidad, y bajo condiciones favorables de agua temperatura y luz.

- b) Plántulas que poseen todas las estructuras esenciales siguientes cuando se ensayan en sustrato artificial.

Se clasificarán como normales, las plántulas con las siguientes características (anexo 10). Plántulas anormales son aquellas que no manifiestan capacidad para continuar su desarrollo hacia plantas normales cuando crecen en un suelo de buena calidad, y bajo condiciones favorables de agua, temperatura y luz.

Se clasificarán como anormales, las plántulas con los defectos siguientes, cuando se ensayan sobre un sustrato artificial (anexo 11).

Su cálculo se realizó de la manera siguiente (ISTA, 1976) :

$$PG = \frac{\text{Numero de semillas germinadas}}{\text{Numero de semillas sembradas}} \times 100$$

- **Ensayos de vigor**

Para dicho ensayo se sembraron 100 semillas en 5 filas de 20 con cuatro repeticiones, posteriormente se trasladaron a la cámara de germinación a una temperatura que se mantuvo a 28 ° C. Se realizó una evaluación al 10 día de transcurridos en la cámara de germinación . Las plántulas se clasificaron como vigorosas y débiles, de acuerdo a las siguientes características que definen a las plántulas :

a) Vigorosas

- Raíz : larga vigorosa, que sobre pase la mitad del largo normal.
- Hipocotilo: largo vigoroso, que sobre pase la mitad del largo normal, sin hendiduras ni lesiones que alcancen el tejido conductor central.
- Cotiledones: dos , sin necrosis ni lesión.

b) Débiles

- Raíz: ausente, claramente reducida a menos de la mitad del largo normal, con puntas engrosadas o manchadas.
- Hipocotilo : Claramente reducido a menos de la mitad del largo normal, muy torcido, granuloso, con lesiones o hendiduras.
- Cotiledones: sólo uno, con lesión o necrosis.
- Plántula completa; mal desarrollada, de tamaño reducido, cotiledones hinchados, hipocotilo y raíz extremadamente cortos.

**3.3.1.1.2 Prueba de germinación**

**a) Diseño experimental**

El experimento se llevó a cabo bajo el Diseño completamente al azar, que es útil cuando las unidades experimentales son esencialmente homogéneas (Steel y Torrie, 1996).

➤ **Modelo lineal aditivo**

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$\mu$  = Media Poblacional

$T_i$  = Efecto del  $i$  – ésimo tiempo de almacenamiento de la semilla

$\varepsilon_i$  = Error experimental

➤ **Comparación de medias**

Los datos de la variable porcentaje de germinación (%) fueron transformados mediante :

$$\text{Arc sen } \sqrt{\%}$$

Después del análisis de varianza las medias de los tratamientos fueron comparadas a través de la prueba de Duncan al nivel del 95 % de confianza (Reyes,1999 ; Steel y Torrie,1996).

El análisis de varianza se realizó con el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) Versión 6.11.

### **b) Factores del ensayo**

Los factores y niveles del ensayo en esta fase se detallan en el siguiente cuadro:

**Cuadro 2. Factores y niveles del ensayo**

<b>Factores</b>	<b>Niveles de los factores</b>
Factor "A"	0 días
	21 días
Tiempo de almacenamiento de la semilla	42 días
	63 días

### **c) Tratamientos**

Los tratamientos del ensayo se detallan en el siguiente cuadro:

**Cuadro 3. Tratamientos del ensayo**

<b>Tratamientos</b>	<b>Descripción</b>
Tratamiento 1	0 días de almacenamiento de la semilla
Tratamiento 2	21 días de almacenamiento de la semilla
Tratamiento 3	42 días de almacenamiento de la semilla
Tratamiento 4	63 días de almacenamiento de la semilla

#### **d) Características del área experimental**

La primera fase de la investigación se realizó en el laboratorio de la Oficina Regional de Semilla. Para lo cual se usó la cámara de germinación con las siguientes condiciones:

Temperatura	=	28 ° C
Humedad	=	Controlada
Repeticiones	=	3

#### **e) Variables de respuesta**

- **Ensayo de germinación**

La determinación del porcentaje de germinación se realizó para cada tiempo de almacenamiento en una cámara de germinación graduada a temperatura constante de 28 °C , siguiendo la metodología propuesta por el ISTA.

Su cálculo se realizó de la manera siguiente (ISTA,1976):

$$PG = \frac{\text{Numero de semillas germinadas}}{\text{Numero de semillas sembradas}} \times 100$$

- **Tasa de germinación (TG)**

Para el cálculo de los valores promedios se utilizó la siguiente ecuación (Hartmann y Kester ,1999):

$$TG = \frac{(N_1 \times T_1 + N_2 \times T_2 \dots\dots + N_n \times T_n)}{\text{Numero de semillas sembradas}}$$

Donde :

$N_n$  = Numero de semillas germinadas en el día "n"

$T_n$  = Tiempo expresado en días

### **3.3.1.2 Desarrollo del ensayo**

La primera fase de la investigación comprende las siguientes actividades:

#### **a) Selección de fuente semillera**

Inicialmente se hizo un recorrido por las zonas donde se tenía referencia de que existían establecidos cultivos de estevia, pero lamentablemente debido al poco conocimiento acerca del manejo del cultivo, el futuro incierto acerca de su comercialización muchos de ellos quedaron en el olvido.

La fuente semillera elegida fue una parcela con mas de 10 años de establecido el cultivo, en la colonia de Santa fe de Caranavi.

#### **b) Recolección de semilla**

Se realizó la cosecha en los arbustos que empezaban la diseminación, el método utilizado por el agricultor consistía en cortar todas las inflorescencias de la planta.

#### **c) Muestreo**

Se efectuó mediante el método de división en dos que consiste en colocar la muestra sobre cartulina y mezclar a mano, se dividió en cuatro partes con ayuda de una espátula y se descartaron las cuartas partes opuestas, este

proceso se realizó hasta llegar a obtener la muestra final del peso aproximado que se requería para los análisis.

#### **d) Almacenamiento de la semilla**

Se almacenó la semilla con alta humedad y bajo condiciones adversa de almacenamiento ( altas temperaturas y alta humedad relativa ).

En el trabajo se uso la semilla de una misma cosecha con el propósito de que la variación en la calidad fisiológica de las semillas causadas por la condición del almacenamiento fuera la única fuente de variación.

#### **e) Trabajo de laboratorio**

Se realizó los siguientes análisis para cada tiempo de almacenamiento de la semilla:

##### Características físicas

- Análisis de pureza
- Determinación del contenido en agua
- Determinación del peso de 1000 semillas

##### Características biológicas

- Ensayo de germinación
- Ensayo para la determinación de la viabilidad
- Pruebas de vigor

### 3.3.2 Pruebas en almacigo

La segunda fase del trabajo correspondió a la determinación del efecto del tiempo de almacenamiento en la propagación, esta fase se llevó a cabo en vivero.

#### 3.3.2.1 Planteamiento del ensayo

##### a) Diseño experimental

El diseño experimental utilizado en esta fase del presente estudio fue el de Bloques completos al azar con tres tratamientos y tres repeticiones (Steel y Torrie, 1996).

##### ➤ Modelo lineal aditivo

$$Y_{ij} = \mu + \beta_k + \alpha_i + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Una observación cualquiera

$\mu$  = Media Poblacional

$\beta_k$  = Efecto del k – ésimo bloque

$\alpha_i$  = Efecto del i – ésimo tiempo de almacenamiento de la semilla

$\varepsilon_{ik}$  = Error experimental

##### ➤ Comparación de medias

Los datos de la variable porcentaje de germinación ( % ) fueron transformados mediante :

$$\text{Arc sen } \sqrt{\%}$$

Después del análisis de varianza las medias de los tratamientos fueron comparadas a través de la prueba de comparaciones múltiples de Duncan al nivel del 95 % de confianza (Reyes, 1999; Steel y Torrie, 1996 ).

El análisis de varianza se realizó con el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) Versión 6.11.

### **b) Factores del ensayo**

Los factores y niveles de ensayo en el almacigo se detallan en el siguiente cuadro:

**Cuadro 4. Factores y niveles del ensayo**

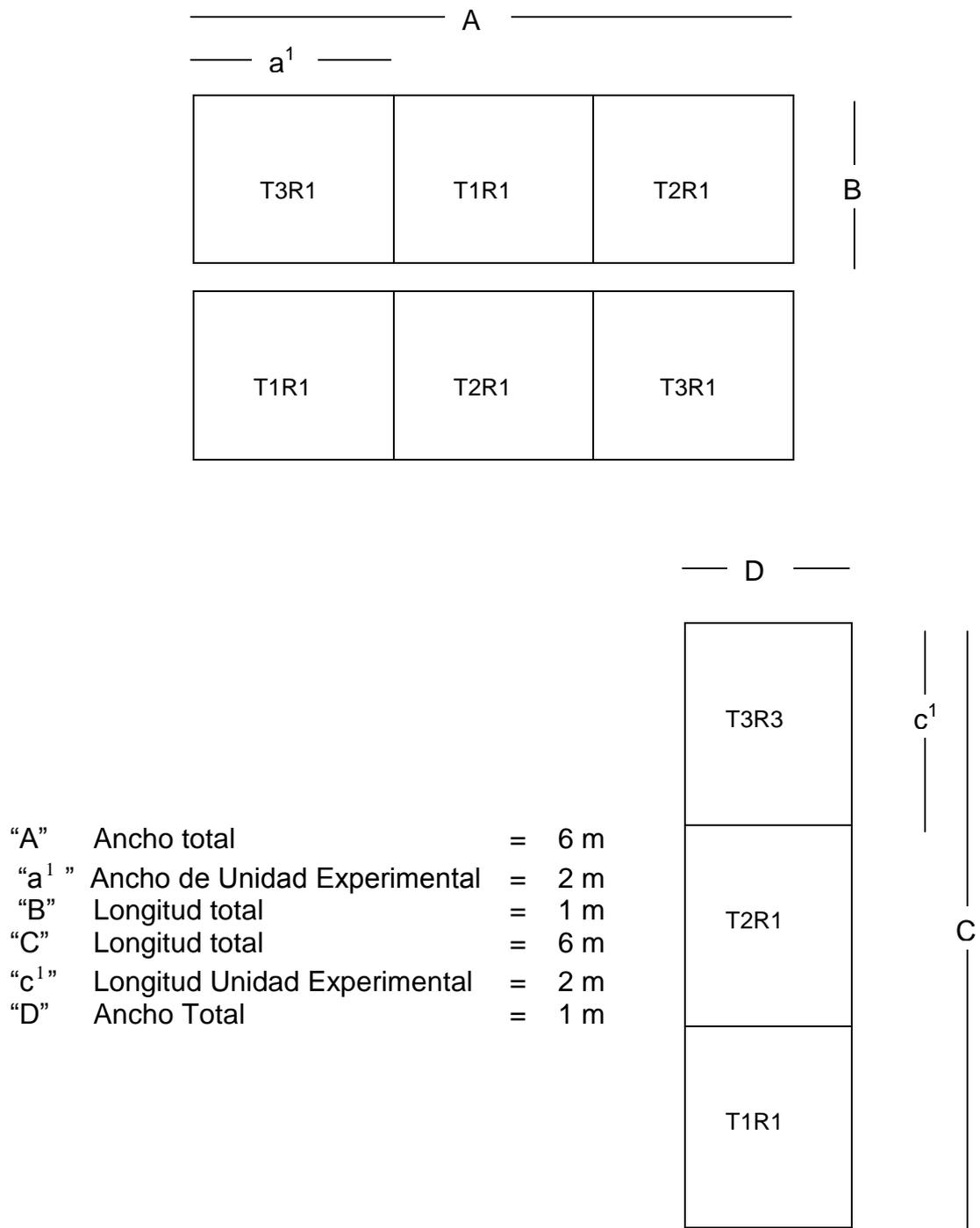
<b>Factores</b>	<b>Niveles de los factores</b>
Factor "A"	
	21 días
Tiempo de almacenamiento de la semilla	42 días
	63 días

### **c) Tratamientos**

Los tratamientos del ensayo en la fase de almacigo se detallan en el siguiente cuadro:

**Cuadro 5. Tratamientos del ensayo**

<b>Tratamientos</b>	<b>Descripción</b>
Tratamiento 1	21 días de almacenamiento de la semilla
Tratamiento 2	42 días de almacenamiento de la semilla
Tratamiento 3	63 días de almacenamiento de la semilla



**Figura 2. Croquis del ensayo en Vivero (almacigo)**

#### **d) Características del área experimental**

La segunda fase de la investigación se la realizó en el vivero del ISTAIC, para lo cual se hizo la construcción de las camas de siembra con las siguientes características:

Área total del ensayo	=	18 m <sup>2</sup>
Longitud total	=	18 m
Ancho total	=	1 m
Número de repeticiones o bloques	=	3
Área por repetición o por bloque	=	6 m <sup>2</sup>
Ancho de bloque	=	1 m
Área por unidad experimental	=	2 m <sup>2</sup>

#### **e) Variables de respuesta**

- **Ensayo de germinación**

La determinación del porcentaje de germinación se realizó para cada tiempo de almacenamiento de la semilla.

- **Tasa de germinación (TG)**

La determinación de la tasa de germinación se realizó para cada tiempo de almacenamiento de la semilla

- **Longitud de radícula y plúmula**

Para esta prueba se tomaron 3 muestras tomadas de forma aleatoria de cada repetición, se midió la longitud de la raíz primaria y de la parte aérea, esta evaluación se realizó a los 10 días de iniciada la prueba de germinación.

- **Altura de plántula 35 días después de la siembra**

Para esta evaluación se tomaron 10 plántulas al azar de cada cama de siembra por tiempo de almacenamiento de la semilla.

- **Número de plántulas**

Se realizó el conteo de plántulas establecidas la sexta semana después de realizada la siembra, esta operación se realizó por cada tiempo de almacenamiento de la semilla.

### **3.3.2.2 Desarrollo del ensayo**

La segunda fase de la investigación comprende las siguientes actividades:

#### **a) Preparación de la almaciguera**

Se procedió a la construcción de tres platabandas, cada una con una dimensión de 6 x 1 x 0.20 m. La preparación del sustrato se realizó con una relación de dos partes de arena fina y una de materia orgánica (humus).

#### **b) Preparación de semilla**

Se procedió a la selección de las semillas, eliminando hojas y tallos secos que se encontraban junto a ella.

#### **c) Proceso de almacigado (Siembra)**

Las semillas se distribuyeron al voleo sobre la superficie del sustrato. Por ser fotoblastica no se cubrió con tierra, solamente se presionó, luego se cubrió con malla milimétrica, para evitar que sea arrastrada por el viento. Esta operación

se realizó para cada tiempo de almacenamiento de la semilla, es decir cada 21 días.

#### **d) Cuidados culturales**

Durante el crecimiento en la almaciguera se construyó una semi sombra para proteger a las plántulas de la insolación.

El riego se realizó tres veces al día durante los 10 primeros días, posteriormente se disminuyó la frecuencia de aplicación.

### **3.3.3 Pruebas de campo**

En esta fase se observó el comportamiento de las plántulas obtenidas de semillas con diferentes tiempos de almacenamiento y 3 estados fisiológicos en el momento del transplante, este trabajo se realizó en terreno definitivo.

#### **3.3.3.1 Planteamiento del ensayo**

##### **a) Diseño experimental**

Cochran y Cox (1965), indican que en algunos experimentos de campo se introduce un factor adicional dentro del experimento, si este planteado originalmente para probar un factor "A" permite la introducción de un factor "B" adicional dentro de cada parcela, los niveles de "B" se denominan parcelas divididas.

El dispositivo experimental que se usó fue de parcelas divididas en un diseño de Bloques completamente al azar.

- **Modelo lineal aditivo**

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_k + \alpha_i + \varepsilon_{ik} + \gamma_j + (\alpha\gamma)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde.

$Y_{ijk}$  = Una observación cualquiera.

$\mu$  = Media Poblacional.

$\beta_k$  = Efecto del k – ésimo bloque.

$\alpha_i$  = Efecto del i – ésimo estado fisiológico en el momento del transplante

$\varepsilon_{ik}$  = Error de la parcela principal.

$\gamma_j$  = Efecto del j – ésimo tiempo de almacenamiento de la semilla

$(\alpha\gamma)_{ij}$  = Efecto del i –ésimo estado fisiológico en el momento del transplante con el j – ésimo tiempo de almacenamiento de la semilla

$\varepsilon_{ijk}$  = Error experimental.

- **Comparación de medias**

Los datos de la variable porcentaje de plantas prendidas (%) fueron transformados mediante :

$$\text{Arc sen } \sqrt{\%}$$

Después del análisis de varianza las medias de los tratamientos fueron comparadas a través de la prueba de comparaciones múltiples de Duncan al nivel del 95 % de confianza (Reyes, 1999; Steel y Torrie, 1996).

El análisis de varianza se realizó con el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) Versión 6.11.

### b) Factores de ensayo

Los factores y niveles de ensayo a nivel de campo se detallan a continuación:

**Cuadro 6. Factores y niveles del ensayo**

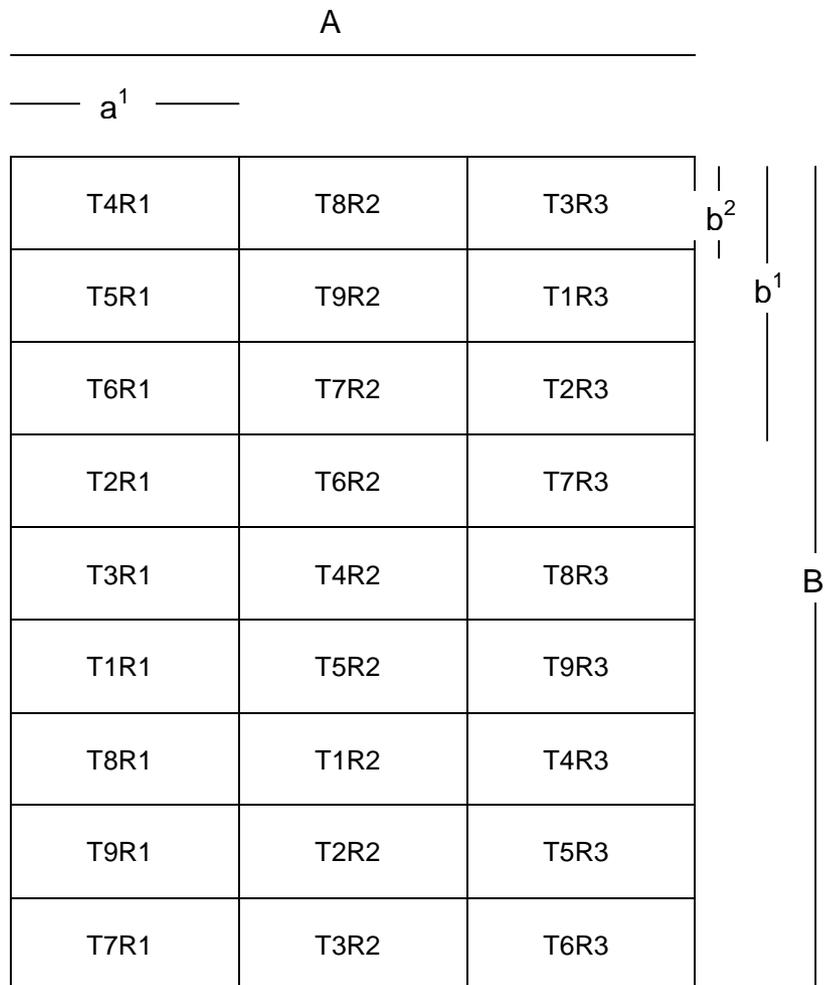
<b>Factores</b>	<b>Niveles de los factores</b>
Factor "A"	
Estado fisiológico en el momento del trasplante	6 Pares de hojas 8 Pares de hojas 10 Pares de hojas
Factor "B"	
Tiempo de almacenamiento de la semilla	21 días 42 días 63 días

### c) Tratamientos

Los tratamientos del ensayo en la fase de campo se detallan a continuación:

**Cuadro 7. Tratamientos del ensayo**

<b>Tratamientos</b>	<b>Combinación</b>	<b>Descripción</b>
Tratamiento 1	a1x b1	6 pares de hojas x 21 días de almacenamiento
Tratamiento 2	a1x b2	6 pares de hojas x 42 días de almacenamiento
Tratamiento 3	a1x b3	6 pares de hojas x 63 días de almacenamiento
Tratamiento 4	a2x b1	8 pares de hojas x 21 días de almacenamiento
Tratamiento 5	a2x b2	8 pares de hojas x 42 días de almacenamiento
Tratamiento 6	a2x b3	8 pares de hojas x 63 días de almacenamiento
Tratamiento 7	a3x b1	10 pares de hojas x 21 días de almacenamiento
Tratamiento 8	a3x b2	10 pares de hojas x 42 días de almacenamiento
Tratamiento 9	a3x b3	10 pares de hojas x 63 días de almacenamiento



“A”	Ancho total	= 9 m
“a <sup>1</sup> ”	Ancho de bloque	= 3 m
“B”	Longitud total	= 18 m
“b <sup>1</sup> ”	Longitud parcela pequeña	= 2 m
“b <sup>2</sup> ”	Longitud parcela grande	= 6 m

**Figura 3. Croquis del ensayo en campo**

#### d) Características del área experimental

La última fase de la investigación se realizó en los predios del ISTAIC, con las siguientes características:

Área total del ensayo	=	162	m <sup>2</sup>
Longitud total	=	18	m
Ancho total	=	9	m
Numero de repeticiones o bloques	=	3	
Área por repetición o por bloque	=	54	m <sup>2</sup>
Ancho de bloque	=	3	m
Área por unidad experimental	=	6	m <sup>2</sup>
Número de plantas por unidad experimental	=	49	plantas
Distancia entre surcos	=	0.5	m
Distancia entre plantas	=	0.25	m

#### e) Variables de respuesta

- **Porcentaje de plantas prendidas**

Se contaron el número total de plantas arraigadas, 21 días después de realizado el trasplante. El porcentaje de plántulas prendidas se obtuvo con la siguiente fórmula :

$$Pp = \frac{\text{Número de plántulas prendidas}}{\text{Número de plántulas transplantadas}} \times 100$$

- **Altura de planta**

Se midió desde el suelo hasta la yema apical de brote. Estas mediciones se realizaron aproximadamente dos semanas antes de realizar el corte de uniformización.

- **Diámetro de tallo**

Estas mediciones se realizaron aproximadamente dos semanas antes de realizar el corte de uniformización.

### **3.3.3.2 Desarrollo del ensayo**

#### **a) Ubicación y limpieza del terreno**

Para el establecimiento del ensayo se ubicó el terreno con una pendiente del 5 %, topografía no accidentada. Se realizó el corte de la cobertura vegetal, seguidamente la limpieza.

#### **b) Preparación del terreno a trasplantar**

La remoción del suelo se realizó en forma manual, utilizando para tal efecto picotas azadones y rastrillos, concluida la remoción se procedió al mullido, para finalizar con el nivelado.

#### **c) Trazado y distribución de las unidades experimentales**

El trazado de las unidades experimentales se realizó considerando el aislamiento espacial requerido, la distribución de las mismas de acuerdo al diseño planteado.

En la demarcación de las unidades experimentales los ángulos rectos se determinaron mediante el método de triangulación.

#### **d) Repique y trasplante**

El trasplante se realizó cuando las plántulas completaron sus edades fisiológicas respectivas en la almaciguera.

6 pares de hojas

8 pares de hojas

10 pares de hojas

Las plántulas se trasplantaron a una distancia de 0.50 m entre surcos y 0.20 m entre plantas.

#### **e) Labores culturales**

Las principales labores culturales efectuadas fueron el control de malezas, y el riego.

El control de malezas se realizó en dos oportunidades, debido a la poca altura de la planta, a la extensión de su ciclo, al número de cortes que admite y a su rendimiento, reviste especial significación para evitar su competencia y posibilitar la obtención de una cosecha satisfactoria.

El riego después de realizado el trasplante se hizo 2 veces al día durante 7 días para asegurar el mayor número de plantas arraigadas. Después la frecuencia de riego se disminuyó.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados obtenidos durante el ensayo en cuanto a las condiciones experimentales y variables de respuesta se detallan a continuación:

### 4.1 Laboratorio

#### 4.1.1 Caracterización física biológica de la semilla

##### 4.1.1.1 Análisis de pureza

El análisis de pureza se determinó sobre una muestra de trabajo que se tomó de la muestra remitida.

**Cuadro 8. Porcentaje de pureza de semillas de estevia**

<b>Especie</b>	<b>Peso muestra</b>	<b>Semilla pura</b>	<b>Otras semillas</b>	<b>Materia inerte</b>
estevia	1 g	0.08 g	0.0 g	0.92 g

El análisis permite determinar la composición de la muestra en dos componentes: semilla pura de la especie de interés (0.08 g) y material inerte (0.92 g). El cuadro 8, muestra un 8% de pureza física, con un contenido elevado de materia inerte 92 %.

La naturaleza de la materia inerte se da en las siguientes proporciones: ramas (0.22 g) hojas (0.69 g) y tierra (0.01 g). La identidad de todas las semillas en el examen realizado permite establecer que no existe la presencia de malezas nocivas por lo que el grado de contaminación es del 0 %.

El contenido de impurezas se atribuye a una mala práctica en la cosecha, el manejo y beneficio de la semilla. Debido a la particularidad de que la planta

presenta una floración heterogénea, tardando un mes en producir todas sus flores, observándose el caso particular que en un capítulo floral se encuentran a la vez botones florales, flores y semilla, lo que hace de la cosecha una tarea lenta y difícil.

Ante tal eventualidad el agricultor opta por cortar la inflorescencia en su conjunto para realizar la cosecha, lo que hace que la semilla venga del campo con una serie de impurezas que contribuyen a la pérdida de calidad de la semilla. Estas impurezas son hojas, ramas de la propia planta, insectos, moluscos, arácnidos, etc., que deben ser eliminados para no causar deterioro de la calidad de las semillas.

El beneficio de la semilla se reduce simplemente a la selección de ramas y hojas las más visibles, pero no en su totalidad.

Esta prueba resulta ser importante para decidir la compra entre 2 lotes de semilla, ya que uno con más pureza implica que posee mayor cantidad de semillas que otro con menor porcentaje.

#### 4.1.1.2 Determinación del peso

**Cuadro 9. Análisis de peso de 1000 semillas**

<b>Nº Muestra</b>	<b>Peso 100 semillas (g)</b>
1	0.023
2	0.025
3	0.024
4	0.025
5	0.024
6	0.025
7	0.024
8	0.025

- Media de las muestras = 0.024375 g
- Varianza = 0.000000553 g
- Desvío estándar = 0.0007436 g
- Coeficiente de variación = 3.05 %
- Peso de 1000 semillas = 0.245 g
- Semillas por kilogramo = 4.081.632

Se determinó el número de semillas en un peso dado de semilla pura y se calculo el peso para 1000 semillas manualmente. A partir de la muestra de trabajo se contaron ocho repeticiones de 100 semillas cada una al azar.

El coeficiente de variación es inferior al máximo de 4 % que prescribe el ISTA, para este tipo de prueba, por lo que se estima que en la forma de muestreo existe homogeneidad y no es preciso tomar nuevas muestras. El número de semillas por kilogramo resulta ser la primera aproximación a la cantidad, expresada en peso, requerida para producir un número determinado de plantas.

El peso de las semillas es un dato importante para calcular las tasas de siembra en el vivero. El peso depende del tamaño de la semilla, su contenido de humedad y la cantidad de semillas llenas que se expresa como el peso de 1.000 semillas puras.

#### 4.1.1.3.1 Determinación del contenido de humedad

**Cuadro 10. Análisis de la determinación de humedad**

Sub muestra	Peso inicial(g)	Peso final (g)	% de humedad
A	1	0.838	17.1
B	1	0.833	16.9
Promedio		0.8355	17.0

Se efectuó una doble determinación sobre la muestra de trabajo tomadas independientemente. El cuadro 10 presenta el contenido de humedad en las semillas de 17 % obteniéndose una diferencia entre replicas de 0.2 % valor inferior al determinado por el ISTA para esta prueba ( anexo 5).

El contenido de humedad indica el estado de conservación de la semilla, según esto, las semillas pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: las que necesitan mantener un alto contenido de humedad denominadas recalcitrantes y las de contenido de humedad bajos u ortodoxas. Las primeras son sensibles al almacenamiento, ya que pierden la humedad en pocas semanas y a la vez su capacidad de germinar. El otro grupo de semillas pueden conservar su viabilidad por muchos años, por lo que no tienen problemas en el almacenamiento (Hartmann y Kester ,1999) .

Las semillas de estevia parecen ser del tipo ortodoxa (Felipe, 1971), es decir, soportan bajas temperaturas y bajos contenidos de humedad en condiciones de cámara fría.

El alto porcentaje de humedad de las semillas y el almacenamiento en condiciones adversas determinara el comportamiento de la semilla en :

- La capacidad de almacenamiento

La calidad de las semillas disminuye con el transcurso del tiempo y la tasa de deterioro depende de las condiciones ambientales durante el almacenamiento, el tiempo en que estas permanecen almacenadas y la humedad con que las semillas son almacenadas.

El almacenamiento de semillas bajo condiciones adversas (altas temperaturas y alta humedad relativa) ocasiona el envejecimiento de las mismas, lo que provoca una variedad de síntomas que van desde la reducción en la

viabilidad o la capacidad de germinación, entonces la capacidad de almacenamiento es mínima.

El valor de humedad hallado 17 % determina que para el correcto manejo de la semilla, esta primeramente debe secarse para un correcto almacenamiento.

- La susceptibilidad al ataque de hongos

El valor de humedad hallado ( 17 %), indica que la semilla almacenada con alta humedad favorece al daño producido por hongos, especialmente de los géneros *Aspergillus* y *Penecillum*. Lo anterior concuerda con lo mencionado ampliamente por Delouche y Gadwell (1967), quienes consideran que el grado en que los hongos de almacenamiento invaden las semillas y disminuyen su capacidad de germinación depende, en gran medida, del contenido de humedad de las mismas.

#### 4.1.1.4 Ensayo para la determinación de la viabilidad

La prueba de tetrazolio nos permite apreciar los siguientes resultados:

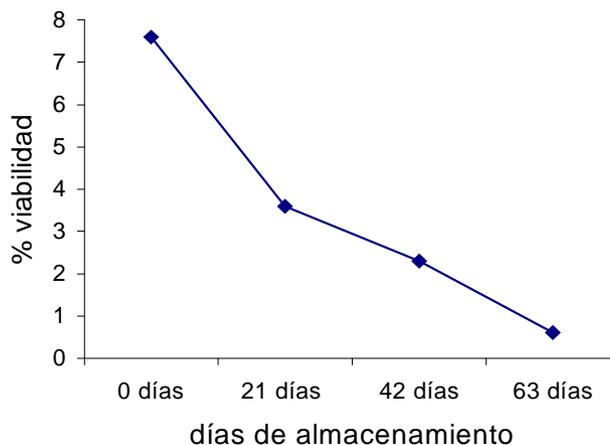
**Cuadro 11. Análisis de la prueba de viabilidad**

<b>Tiempo de almacenamiento</b>	<b>Semilla viable</b>	<b>Semilla no viable</b>	<b>Semilla muerta</b>	<b>Semilla vana</b>
0 días de almacenamiento	7.6	0.6	0.33	91.33
21 días de almacenamiento	3.6	2.6	1.66	92
42 días de almacenamiento	2.3	2.3	2.66	92.6
63 días de almacenamiento	0.6	1.33	5.33	92.6

El cuadro 11, permite apreciar el tiempo durante el cual la semilla de estevia conserva su capacidad de germinar. La viabilidad se reduce drásticamente de 7.6 % al inicio de la prueba, valor obtenido inmediatamente después de realizada la cosecha a un 0.6 % después de 63 días de almacenamiento de la semilla.

También se observa una tendencia creciente en el porcentaje de semillas muertas a medida que aumenta el periodo de almacenamiento. Esta tendencia de semillas no viables cuyo origen se asocia el mayor porcentaje correspondiente a las condiciones adversas en las que fue almacenada la semilla, la humedad de la misma y en menor proporción a adversidades ambientales, daño mecánico y daño entomológico.

Las semillas vanas (vacías), son consecuencia de una polinización deficiente (Arista & Talavera, 1996), o producción de falsos híbridos matroclinos<sup>1</sup> debido a la pseudogamia<sup>2</sup> por la polinización cruzada.



**Figura 4. Efecto del tiempo de almacenamiento en la viabilidad de la semilla**

La figura 4, permite apreciar dos hechos que valen la pena remarcar :

-----  
<sup>1</sup>Herencia en la que los descendientes se parecen más a la madre que al padre. Ello puede ser debido a varias causas: a la exclusión de los cromosomas paternos en los híbridos, después de la fecundación o durante el desarrollo.

<sup>2</sup>Modalidad de desarrollo apomítico en el cual el espermatozoide, sin entrar a formar parte del núcleo definitivo del cigoto, actúa como excitante de la partenogénesis y facilita la producción de falsos híbridos matroclinos .

a) El bajo porcentaje de viabilidad

El bajo porcentaje de viabilidad es el resultado de ciertos factores: el genético ya que es una planta alógama y para que se lleve a cabo la polinización requiere de agentes polinizadores. Una vez realizada la polinización el desenvolvimiento del tubo polínico ve su crecimiento interrumpido antes de llegar a la oosfera ya que la especie posee autoincompatibilidad<sup>3</sup> de tipo esporofítico<sup>4</sup> y la formación de falsos híbridos matroclinos se produce por pseudogamia.

Las condiciones climatológicas y nutricionales desfavorables antes de la cosecha, que reducen la calidad de la semilla, si consideramos que la calidad queda determinada antes de la cosecha y no después de la misma.

b) La rapidez de la pérdida de la capacidad de germinación

La viabilidad al final de cualquier periodo de almacenamiento en teoría es la resultante de la viabilidad inicial en la cosecha, lo que no siempre se da (Hartmann y Kester ,1999).

El tiempo de vida de las semillas es influenciado por las condiciones en que las semillas son almacenadas ( temperatura y humedad atmosférica) y la humedad de la semilla. Se determino una duración de 63 días de viabilidad para las semillas de estevia, resultados que se aproximan a los encontrados por Steviaparaguay (2002), que sostiene que la viabilidad baja mucho después de cuarenta días por lo que recomienda la siembra inmediatamente después de realizada la cosecha para asegurar la frescura y el vigor .

---

<sup>3</sup> Estado de una planta que, teniendo los gametos bien conformados y viables, no puede ser fecundada por su propio polen a causa de alguna acción inhibidora ejercida en general por los tejidos del estilo.

<sup>4</sup> Concerniente al esporofítico. Las esporas se desarrollan y dan lugar a pequeños gametofitos en los óvulos y los granos de polen.

#### 4.1.1.5 Ensayo de germinación

Respecto a la germinación, esta es del tipo epigea<sup>5</sup> cada aquenio contiene normalmente una semilla.

El número de semillas germinadas fue registrado cada día, durante un periodo de 10 días como establece el ISTA (1996).

**Cuadro 12. Análisis de la prueba de germinación**

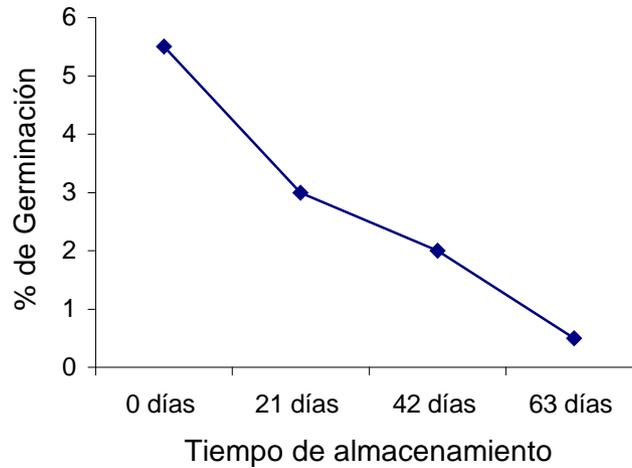
<b>Tiempo de almacenamiento</b>	<b>Porcentaje de germinación (%)</b>
0 días de almacenamiento	5.5
21 días de almacenamiento	3
42 días de almacenamiento	2.0
63 días de almacenamiento	0.5

El cuadro 12, permite apreciar los resultados del porcentaje de germinación en semillas almacenadas durante : 0 , 21, 42, y 63 días respectivamente después de la cosecha, obteniéndose valores de 5.5 , 3.0, 2.0 y 0.5 % para la especie respectivamente.

La disminución del porcentaje de germinación (figura 5), responde a la pérdida de la viabilidad ocasionados por el envejecimiento, el deterioro de las membranas celulares es uno de los daños mas aparentes y que ocasiona la pérdida de la viabilidad de las semillas, que es propiciada por las condiciones adversas (altas temperaturas y alta humedad relativa), al que fueron sometidas durante el almacenamiento ( Bewley y Black ,1994).

-----  
<sup>5</sup> Germinación en la cual los cotiledones nacen por encima del suelo. Convirtiéndose en los primeros órganos fotosintéticos.

La figura 5, permite apreciar como el porcentaje de germinación baja en relación directa con el tiempo de almacenamiento de la semilla.



**Figura 5. Efecto del almacenamiento de la semilla en el porcentaje de germinación**

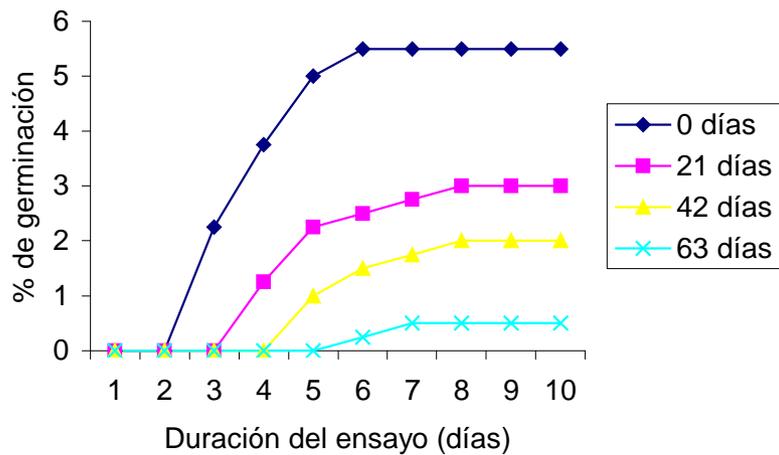
La figura 6, permite apreciar el tiempo de duración del proceso de germinación, que comprende desde el inicio de la germinación hasta el fin del dicho proceso.

El inicio de la germinación para la semilla con “0” días de almacenamiento fue a los 3 días de iniciado la prueba, finalizando el día 6.

El inicio de la germinación para la semilla almacenada por 21 días se registro el 4 día después de iniciado la prueba finalizando el día 8.

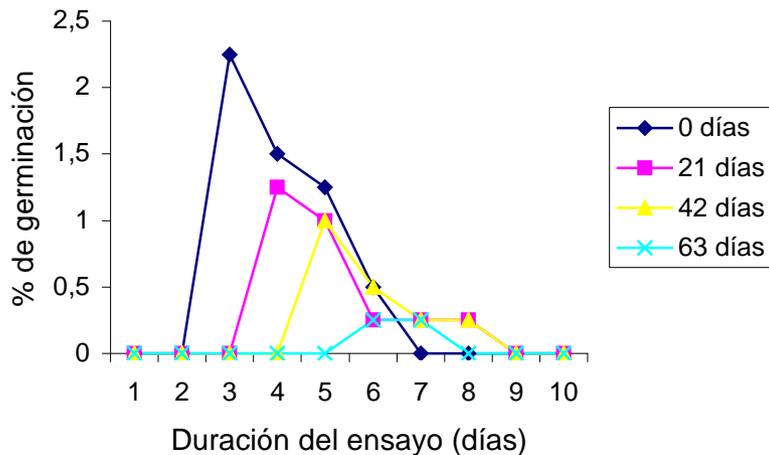
El inicio de la germinación para la semilla almacenada por 42 días se registro el 5 día después de iniciado la prueba finalizando el día 8.

El inicio de la germinación para la semilla almacenada por 63 días se registro el 6 día después de iniciado la prueba finalizando el día 7.



**Figura 6. Duración del proceso de germinación por tiempo de almacenamiento de la semilla**

En la figura 7, se aprecia en primera instancia que la semilla de estevia presenta una germinación rápida pues esta comienza en promedio a los 4 días y finaliza el día 7, por lo cual el problema de latencia<sup>6</sup> esta ausente. La velocidad de germinación es del tipo abrupto, esto es, que el potencial máximo de germinación se alcanza en pocos días después del inicio de la prueba.



**Figura 7. Velocidad de germinación por tiempo de almacenamiento de la semilla**

<sup>6</sup> Es el resultado de condiciones internas de la semilla (distintos a la no viabilidad) que impiden la germinación

La diferencia en las respuestas germinativas tanto en el proceso de germinación y la velocidad de germinación, son a consecuencia del almacenamiento de la semilla, donde los mecanismos energéticos y de síntesis son afectados (Seed New, 2002). Así mismo, la respuesta germinativa típicamente unimodal (figura 7), denota que la semilla no presenta ningún tipo de latencia y según Triviño *et al.*, (1990), presenta una baja viabilidad en condiciones naturales.

#### 4.1.1.6 Relación viabilidad y germinación

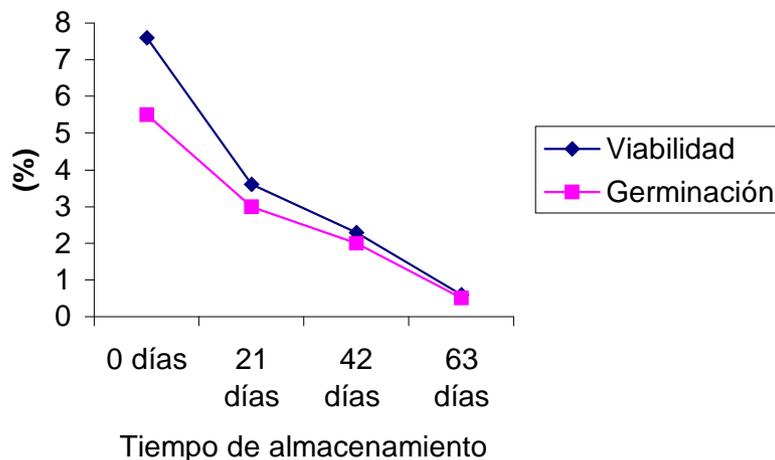
**Cuadro 13. Análisis de la prueba de viabilidad y germinación**

<b>Tiempo de almacenamiento</b>	<b>Viabilidad (%)</b>	<b>Germinación (%)</b>
0 días de almacenamiento	7.6	5.5
21 días de almacenamiento	3.6	3
42 días de almacenamiento	2.3	2.0
63 días de almacenamiento	0.6	0.5

La prueba de tetrazolio indica que el 27 % de las semillas que no germinaron eran viables para la semilla almacenada por “ 0 “ días, el 16 % para la semilla almacenada por 21 días, el 3 % para la semilla almacenada por 42 día y 17 % para la semilla con 63 días de almacenamiento (cuadro 13 y figura 8).

Este evento puede ser resultado de que la prueba fue llevada a cabo a una temperatura promedio de 28 °C y según Randl (1981) observó que el mayor porcentaje de germinación se verificó a 25 °C, temperaturas sobre el óptimo aceleran la velocidad del proceso de germinación, desorganizando el proceso, reduciendo el número de semillas que consiguen completarlo.

Generalmente la velocidad de germinación aumenta en forma directa con la temperatura (Taylor *et al.*, 1999).



**Figura 8. Análisis de la prueba de viabilidad y germinación por tiempo de almacenamiento de la semilla**

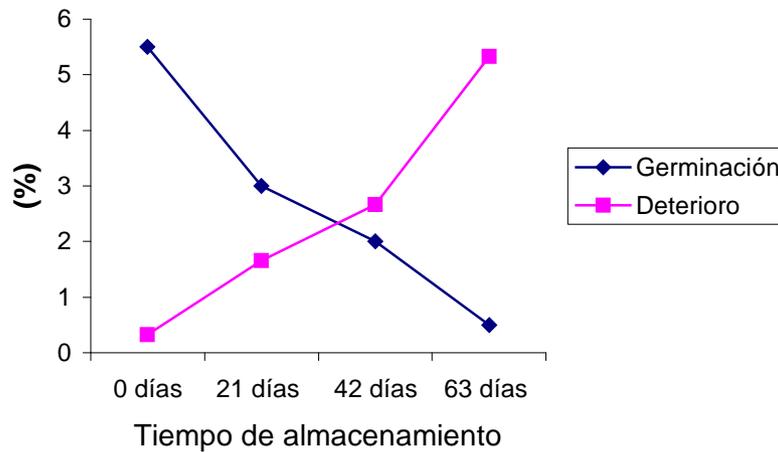
#### 4.1.1.7 Relación deterioro y germinación

**Cuadro 14. Análisis de la relación deterioro y germinación**

Tiempo de almacenamiento	Germinación (%)	Deterioro (%)
0 días de almacenamiento	5.5	0,33
21 días de almacenamiento	3.0	1,66
42 días de almacenamiento	2.5	2,66
63 días de almacenamiento	0.5	5,33

Las semillas almacenadas presentaron altos signos de deterioro al final de la prueba 5.33 % (63 días de almacenamiento), en contrapartida el porcentaje de germinación disminuyó drásticamente llegando al final de la prueba a 0.5 % (63 días de almacenamiento), como muestra el cuadro 14 y la figura 9.

El 0.33 % de deterioro al inicio de la prueba nos indica que inmediatamente después de la maduración fisiológica de la semilla se activan los procesos de deterioro.



**Figura 9. Análisis de la relación deterioro - germinación por tiempo de almacenamiento de la semilla**

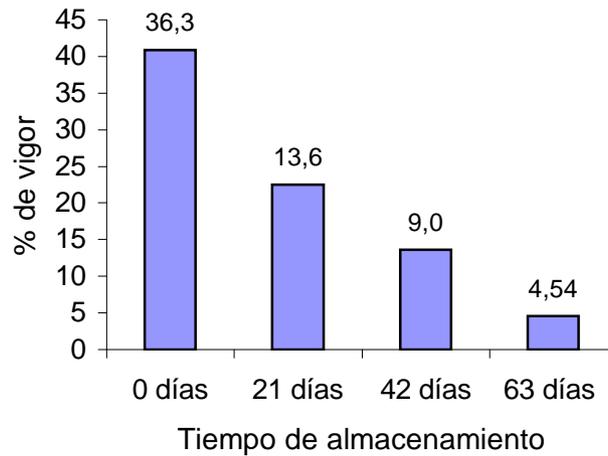
No todas las semillas son almacenadas con éxito, algunas permanecen vivas por tiempo indefinido, quizá varios siglos, cuando se almacenan en el ambiente mas apropiado para interrumpir su deterioro natural. En tanto que otras sufren un deterioro rápido, por causas endógenas, además de las condiciones de almacenamiento. Estas diferencias se deben al hecho de que las semillas son liberadas al medio con diferentes niveles de humedad, composición química y tasa metabólica, lo cual afecta su longevidad potencial, acelerando el proceso de deterioro como muestra la figura 9.

El deterioro tiene una connotación negativa y el porcentaje de germinación una connotación extremadamente positiva.

#### **4.1.1.8 Prueba de vigor**

Los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de vigor disminuye gradualmente con el tiempo de almacenamiento de la semilla.

Se demostró un decremento en el vigor de un 36.3 % en el inicio de la prueba a un 4.54 % después de 63 días de almacenamiento de la semilla como muestra la figura 10.



**Figura 10. Efecto del almacenamiento en el vigor de la semilla**

Las semillas con altos valores de vigor se comportarán mejor en condiciones ambientales estresantes en el momento de la siembra y emergencia a campo, que los que tienen bajo vigor aunque los valores de la capacidad germinativa sean semejantes.

El potencial de almacenamiento de las semillas está relacionado con los valores de vigor al inicio del almacenamiento. Si durante el almacenaje se presentan condiciones de estrés de cualquier tipo, por ejemplo cambios en la temperatura o en la humedad relativa, aquellas semillas con altos valores de vigor estarán en mejores condiciones de resistir esas situaciones ambientales y declinarán en calidad con menor velocidad que aquellos lotes con valores de vigor más bajos. Aún bajo condiciones de almacenaje controladas, a bajas temperaturas y con bajos contenido de humedad de las semillas, el comportamiento luego del almacenamiento dependerá del vigor.

Por lo expuesto anteriormente se espera que la semilla almacenada por “0” días tenga un mejor desempeño en las respuestas germinativas inicialmente y posteriormente un mayor crecimiento y desarrollo de las plántulas obtenidas por presentar un mayor porcentaje de vigor.

#### 4.1.2 Prueba de germinación

##### 4.1.2.1 Análisis de varianza de las variables de respuesta

En el cuadro 15 se presentan los cuadrados medios (varianzas), de las variables de respuesta para los diferentes efectos, donde se observa que los coeficientes de variación son de magnitud aceptable, a excepción del ensayo en el porcentaje de germinación.

**Cuadro 15. Cuadrados medios para las variables de respuesta**

Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de germinación	Tasa de germinación
Tiempo de almacenamiento	3	76.66 **	0.00538 **
Coeficiente de variación		27.32	2.034

\* Significativo al nivel del 5 %

\*\* Altamente significativo al nivel del 1 %

ns No significativo

Como se aprecia en el cuadro 15 hay evidencia altamente significativa para presumir variaciones en el porcentaje de germinación y la tasa de germinación. Esta significancia se debe al efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla.

##### 4.1.2.2 Ensayo de germinación

En el cuadro 16 se determina que se encontró alta diferencia significativa para el factor tiempo de almacenamiento de la semilla, las observaciones se realizaron en un periodo de 63 días, los tiempos de almacenamiento se

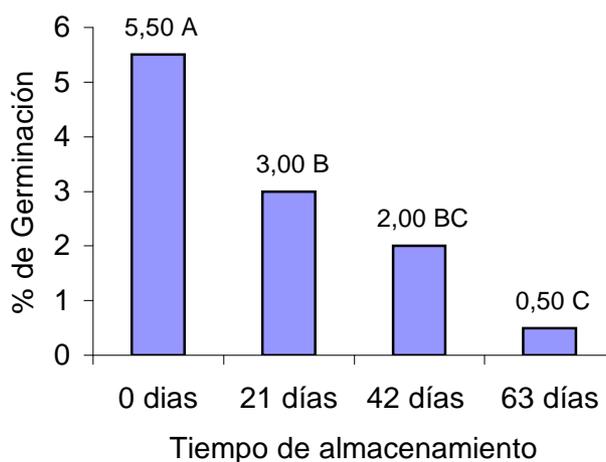
seleccionaron con la idea de observar cual seria el comportamiento de la semilla si se utilizaría inmediatamente después de su cosecha o si debería almacenarse por un corto tiempo antes de su utilización .

**Cuadro 16. Análisis de varianza para efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la germinación**

Fuente	GL	SC	CM	F	Pr $\geq$ F
Tiempo de almacenamiento	3	229,98	76,66	4,08	0,0003
Error	12	65,33	5,44		
Total	15	295,31			

#### 4.1.2.2.1 Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla

La prueba de Duncan ordena tal diferencia para el factor tiempo de almacenamiento de la semilla con respecto a la variable de respuesta como muestra la figura 11.



**Figura 11. Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la germinación**

El análisis de medias nos muestra que la semilla con “0” días de almacenamiento presenta el mayor porcentaje de germinación 5.5 que estadísticamente es diferente a los demás tratamientos. También es importante señalar que la semilla almacenada por 63 días presenta el menor porcentaje de germinación 0.5% y que estadísticamente no presentan diferencias con la semilla almacenada por 42 días.

La germinación comienza con la absorción de agua que desencadena una secuencia de cambios fisiológicos : reinicio de la respiración ; bioquímicos : biosíntesis de energía, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y asociados con la actividad celular, la integridad en las membranas celulares, el transporte y utilización de las sustancias reserva entre las actividades mas importantes (Azcon – Bieto y Talon , 1993).

La reducción en el porcentaje de germinación se da como consecuencia de cambios fisiológicos y bioquímicos producto del almacenamiento de la semilla en condiciones adversas (altas temperaturas, alta humedad atmosférica) ocasionando el deterioro de la misma. Entre los eventos importantes que ocurren durante la germinación y se ven fuertemente afectados por el grado de deterioro de la semilla están : el reinicio de la respiración , reinicio de la síntesis proteica (Bewley y Black, 1994).

La reducción de la actividad respiratoria de la semilla, dado que los mitocondrias<sup>7</sup> toman entre 10 y 40 % mas oxígeno que las semillas frescas, pero la cantidad de ATP<sup>8</sup> producidos por volumen de oxígeno consumido es aproximadamente la mitad con respecto a la semilla sin deterioro (Bewley y Black, 1994).

---

<sup>7</sup> Orgánulo rodeado de una doble membrana, que desarrolla el transporte electrónico, la fosforilación oxidativa y produce la mayoría de ATP.

<sup>8</sup> Nucleótido que almacena energía en los enlaces entre sus tres grupos fosfatos .Esta energía se libera en la hidrólisis para conducir las reacciones sintéticas de la célula.

El reinicio de la síntesis proteica que da lugar, entre otras proteínas, a la formación de enzimas hidrolíticas que producen la movilización de reservas, la reducción en la actividad o el contenido de cualquiera de ellos resulta en la declinación de la actividad de traducción<sup>9</sup> Bewley y Black (1994).

Lo anterior nos lleva a suponer que la reducción en el porcentaje de germinación se hace más evidente cuando es mayor el tiempo de almacenamiento de la semilla en condiciones adversas y el deterioro es también mayor, es así que la semilla con “0” días de almacenamiento presenta mayor germinación y la semilla con 63 días de almacenamiento presenta el menor porcentaje de germinación, resultados que se aproximan a los reportados por Li *et al.*, (1996), y Bewley & Black ,(1994), que sostienen que el almacenamiento de las semillas bajo condiciones adversas ocasiona el envejecimiento de las misma, lo que provoca una variedad de síntomas que van desde la reducción en la viabilidad o capacidad de germinación.

#### 4.1.2.3 Tasa de germinación

**Cuadro 17. Análisis de varianza para efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la tasa de germinación**

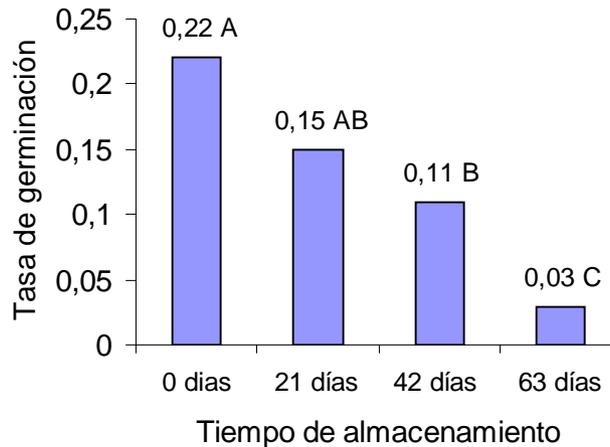
Fuente	GL	SC	CM	F	Pr ≥ F
Tiempo de almacenamiento	3	0.0161	0.00538	11.53	0,0008
Error	12	0.0056	0.000467		
Total	15	0.0217			

El análisis de varianza como muestra el cuadro 17, indica diferencias estadísticas entre las tasas de germinación, lo que nos sugiere que el almacenamiento de la semilla tiene efecto directo. A mayor tiempo de conservación de la semilla la tasa de germinación decae gradualmente.

<sup>9</sup> Aquí el polímero de mRNA es “leído” por una unidad compleja, llamada ribosoma y el resultado es una molécula de proteína.

#### 4.1.2.3.1 Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla

La prueba de Duncan ordena tal diferencia, para el factor tiempo de almacenamiento de la semilla con respecto a la variable de respuesta como muestra la figura 12.



**Figura 12 . Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la tasa de germinación**

La figura 12, determina que existe superioridad estadística en la tasa de germinación del tratamiento 1 (0 días de almacenamiento), con un valor 0.22 que estadísticamente no presenta diferencias con relación a la tasa de germinación del tratamiento 2 (21 días de almacenamiento), que presenta un valor de 0.15.

También se determinó que las semillas del tratamiento 4 (63 días de almacenamiento), presentan estadísticamente la menor tasa de germinación y que es diferente al resto de los tratamientos 0.03.

Las consecuencias del almacenamiento en condiciones adversas, provoca el deterioro en las semillas que son múltiples, secuenciales y que causan el envejecimiento y muerte de las mismas (Seed New, 2002) .

Múltiples ya que la reducción en la tasa de germinación se da después de que la semilla ha sufrido alteraciones en los sistemas fisiológicos: reinicio de la respiración y bioquímicos : biosíntesis de energía y proteínas como afirma Alizaga (1989). Secuenciales ya que el deterioro se va manifestando paulatinamente conforme el tiempo de almacenamiento de la semilla aumenta (cuadro 17 y figura 12).

El primer evento en el deterioro de semillas parece ser la ocurrencia de daños en el sistema de membranas<sup>10</sup>, que son locales importantes para muchas reacciones. Los mecanismos energéticos y de síntesis son también afectados: disminuye la tasa respiratoria y la actividad de muchas enzimas<sup>11</sup>. La reducción en la producción de energía presenta un efecto pronunciado sobre la velocidad de las respuestas germinativas (Seed New ,2002).

La reducción de la tasa de germinación parece ser el primer evento cuantitativo que se observa producto del deterioro de la semilla.

Bajo esta lógica la semilla con 21 días de almacenamiento, donde el deterioro es menor, la tasa de germinación no ha sido reducida significativamente con respecto a la semilla almacenada por “0” días .

La semilla con 63 días de almacenamiento, donde el deterioro es mayor, la tasa de germinación ha sido reducida drásticamente con respecto a la semilla almacenada por “0” días.

---

<sup>10</sup> Lamina delgada de material blando están hechas de proteínas y lípidos que protege y engloba células y orgánulos. Controla el movimiento de las sustancias hacia adentro y hacia afuera,

<sup>11</sup> Proteína que en cantidades muy pequeñas cataliza y controla las reacciones químicas naturales del metabolismo.

## 4.2 Almacigo

### 4.2.1 Análisis de varianza de las variables de respuesta

Esta prueba se realizó en vivero para evaluar a nivel de almacigo y bajo condiciones comerciales, el efecto de los diferentes tiempos de almacenamiento de la semilla en las variables de respuesta.

Los resultados obtenidos durante el ensayo en la fase de almacigo en cuanto a las condiciones experimentales y variables de respuesta se detallan a continuación:

**Cuadro 18. Cuadrados medios para las variables de respuesta**

Fuente de variación	% de germinación	Tasa de germinación	Longitud de radícula	Longitud plúmula	Altura a los 35 DDS	Numero de plántulas
Tiempo de almacenamiento	0.39506 *	0.01015 *	2.19563 **	0.07207**	2.14021**	61477**
Coefficiente de variación	8.03	2.99	17.50	6.77	16.46	6.18

\* Significativo al nivel del 5 %

\*\* Altamente significativo al nivel del 1 %

ns No significativo

Como se evidencia en el cuadro 18, el análisis de la fuente de variación respecto al porcentaje de germinación, tasa de germinación, longitud de radícula, plúmula, altura de plántula a los 35 días después de la siembra (DDS), número de plántulas obtenidas por tratamiento, muestra que existe diferencias, lo que significa que el almacenamiento de la semilla influye directamente sobre estas variables de respuesta.

### 4.2.2 Porcentaje de germinación

La prueba de germinación se emplea en los programas de certificación de semillas como un indicador de la calidad fisiológica Association Of Oficial

Seed Analysts (AOSA) (1983). Uno de los inconvenientes, sin embargo, es que todas las plántulas normales son consideradas con el mismo potencial para producir una planta en el campo, lo que generalmente no es evidente.

Es por esto que en condiciones ambientales desfavorables los resultados de la prueba de germinación en laboratorio pueden diferir considerablemente de la emergencia en campo. Alternativamente al análisis de laboratorio es conveniente que el productor evalúe la calidad fisiológica de la semilla a través de una prueba de germinación en campo.

**Cuadro 19. Análisis de varianza para efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la germinación**

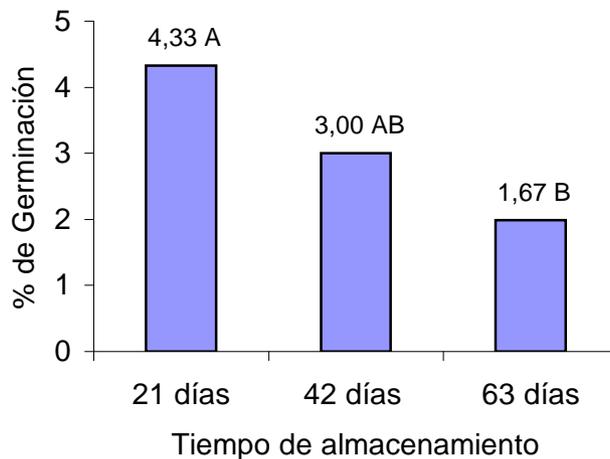
<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Pr ≥ F</b>
Bloque	2	0.01350	0.006754	0.17	0.85
Tiempo de almacenamiento	2	0.79012	0.39506	9.82	0.02
Error	4	0.160850	0.04021		
Total	8				

El análisis de varianza para la variable de respuesta porcentaje de germinación precisa diferencias significativas entre los tiempos de almacenamiento de la semilla.

#### **4.2.2.1 Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla**

De la prueba de comparación de medias para el factor tiempo de almacenamiento de la semilla, se observa que la semilla almacenada por 21 días presenta el mayor porcentaje de germinación 4.33 % y que estadísticamente es igual a la semilla almacenada por 42 días .

Los menores valores en el porcentaje de germinación se obtuvieron con la semilla almacenada por 63 días, donde el tiempo de exposición a las condiciones adversas es mayor.



**Figura 13. Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la germinación**

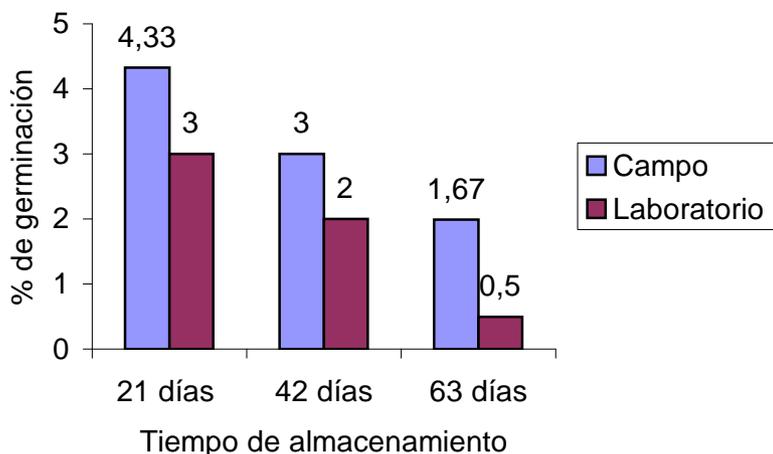
Al analizar el porcentaje de germinación (figura 13) se observa que este parámetro disminuye conforme el deterioro de la semilla es mayor. La disminución en el porcentaje de germinación en la semilla almacenada por 42 y 63 días es, comparativamente mayor. Si bien no hubo diferencias significativas se puede observar que el mayor descenso en el porcentaje de germinación ocurre en la semilla almacenada por 63 días .

Los resultados obtenidos coinciden con lo que afirma Watson (1973), que sostiene que a medida que el deterioro avanza, la resistencia o tolerancia de las semillas a las condiciones ambientales desfavorables disminuye : la emergencia a campo bajo condiciones menos que favorables es reducida.

La figura 13 muestra que la tendencia en el ensayo de germinación en laboratorio, se mantuvo durante la emergencia en campo, siendo menor esta conforme aumentó el tiempo de almacenamiento de la semilla.

Los porcentajes de germinación se reducen conforme los tiempos de almacenamiento de la semilla aumentan en mayor proporción que en la prueba de laboratorio, el proceso de deterioro avanza inexorablemente e

irreversiblemente y mas aun en condiciones ambientales desfavorables (Alizaga ,1989), tendencia que no se cumple en el ensayo ya que el porcentaje de germinación evidentemente va disminuyendo paulatinamente pero no drásticamente como en la prueba de laboratorio como muestra la figura 14.



**Figura 14. Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla en el % de germinación en campo y laboratorio**

Este evento nos sugiere que la semilla de estevia presenta un tipo de rusticidad innata que le permite obtener una mejor respuesta germinativa en su lugar de origen, expuesta a un amplio margen de condiciones ambientales.

#### 4.2.3 Tasa de germinación

**Cuadro 20. Análisis de varianza para efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la tasa de germinación**

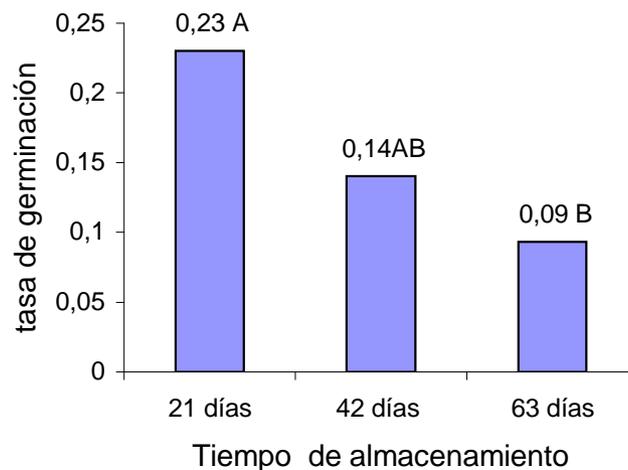
Fuente	GL	SC	CM	F	Pr $\geq$ F
Bloque	2	0.0012245	0.00061225	0.58	0.60
Tiempo de almacenamiento	2	0.020307	0.01015365	9.54	0.03
Error	4	0.004258	0.001064		
Total	8				

El análisis de varianza determina que la tasa de germinación responde de diferente manera al efecto de los tiempos de exposición de la semilla a condiciones adversas durante el almacenamiento.

#### 4.2.3.1 Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla

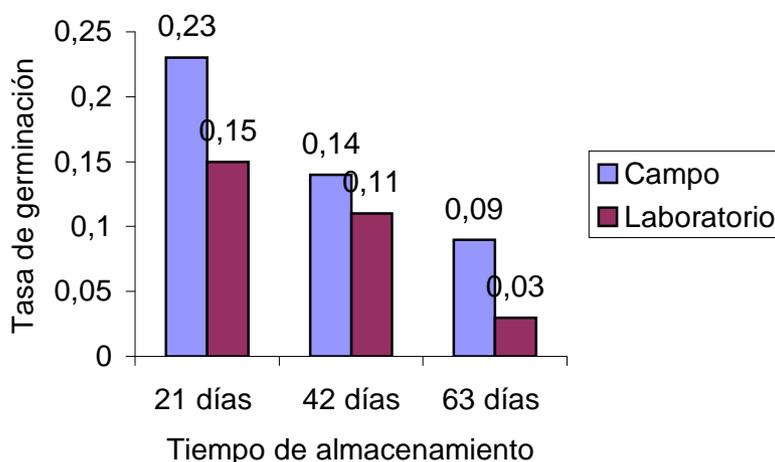
De acuerdo al análisis de varianza cuadro 20 se encontró diferencias entre tiempos de almacenamiento de la semilla, cuyas medias se analizan en la figura 15. La prueba de Duncan determina diferencias no significativas en la tasa de germinación de la semilla almacenada por 21 días con media 0.236 que es igual a las semillas almacenadas por 42 con media de 0.14.

También se puede observar que entre las tasas de germinación de las semillas almacenadas por 42 y 63 días no presentan diferencias significativas, son estadísticamente iguales.



**Figura 15. Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la tasa germinación**

El proceso de deterioro producto del almacenamiento sigue el mismo patrón que la prueba realizada en laboratorio, aunque contrariamente a lo que se esperaba, un mayor efecto en la tasa de germinación esto no sucede así como muestra la figura 16.



**Figura 16. Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla en la tasa de germinación en campo y laboratorio**

#### 4.2.4 Longitud de radícula

La evaluación de la longitud de radícula de las plántulas se realizó 10 días después de iniciado el ensayo de germinación, mostrando grandes diferencias en función del tiempo de almacenamiento de la semilla .

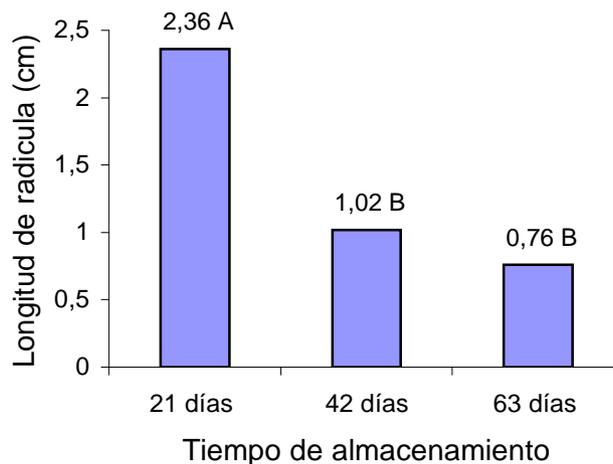
**Cuadro 21. Análisis de varianza para efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la longitud de radícula**

Fuente	GL	SC	CM	F	Pr $\geq$ F
Bloque	2	0.01260	0.00630	0.11	0.90
Tiempo de almacenamiento	2	4.39126	2.19563	37.45	0.0026
Error	4	0.23453	0.05863		
Total	8	4.63840			

#### 4.2.4.1 Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla

La figura 17 muestra la longitud de radícula de las plántulas obtenidas con 21 y 63 días de almacenamiento de la semilla, donde no se hallaron diferencias significativas.

Las mayores longitudes de radícula se alcanzaron con la semilla que fue sometida a un periodo corto de almacenamiento 21 días, la cual es altamente significativa con respecto a la semilla almacenada por 42 y 63 días.



**Figura 17. Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la longitud de radícula**

El deterioro producto del almacenamiento se manifiesta con más intensidad en esta etapa del desarrollo de la plántula, en especial en la : síntesis de proteínas, biosíntesis energética y en la movilización de reservas (Bewley y Black, 1994).

Las semillas contienen cantidades relativamente importantes de reservas alimenticias, que mantienen el crecimiento y el desarrollo de la plántula hasta que esta sea capaz de alimentarse por si misma (Azcon – Bieto y Talon ,1993).

La movilización de las reservas de las semillas requiere un proceso previo de hidrólisis<sup>12</sup> para liberar los compuestos de menor peso molecular, que son utilizados durante el crecimiento inicial de la plántula.

Al iniciarse la germinación se produce una activación de la síntesis proteica que da lugar, entre otras, a la formación de las enzimas hidrolíticas que producen la movilización de las reservas.

La disponibilidad de ATP es un requisito fundamental para numerosas reacciones implicadas en el desarrollo del eje hipocotilo – radicular, para activar el potencial proteínico, proporcionar energía en las secuencias hidrolíticas (Piedrahita,2001).

El almacenamiento de la semilla en condiciones adversas y sus efectos en los primeros estadios de las plántula están asociados fundamentalmente a una reducción en las actividades anteriormente mencionadas. Entonces se explica que las plántulas obtenidas con semilla almacenada por 63 días tenga la menor longitud de la radícula y por el contrario las plántulas obtenidas con semilla almacenada por 21 días tenga la mayor longitud de radícula.

La longitud de la radícula ponen de manifiesto que se logro trabajar con semillas que presentaban diferencias en su calidad fisiológica producto del tiempo de almacenamiento(Salinas *et al.*, 2001).

---

<sup>12</sup> Reacción química que implica la desintegración de una molécula en dos moléculas, con la adición de partes de una molécula de agua.

#### 4.2.5 Longitud de plúmula

La evaluación de la longitud de la plúmula se realizó a los 10 días de iniciada la prueba de germinación al igual que en el caso de la radícula.

**Cuadro 22. Análisis de varianza para efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la longitud de plúmula**

Fuente	GL	SC	CM	F	Pr $\geq$ F
Bloque	2	0.1935556	0.009677	7.48	0.0445
Tiempo de almacenamiento	2	0.1441555	0.072077	55.6	0.0012
Error	4	0.0051777	0.001294		
Total	8	0.1686888			

El comportamiento en esta prueba es similar al observado en la prueba de la radícula es decir se encontró una disminución gradual en la longitud de la plúmula conforme el tiempo de almacenamiento se incrementó .

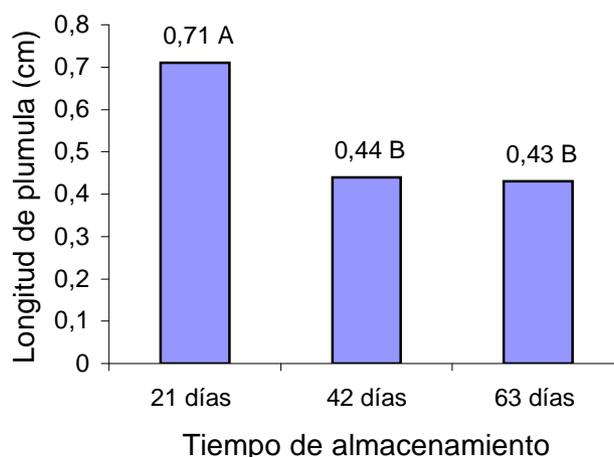
##### 4.2.5.1 Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla

Los resultados obtenidos en el análisis de la longitud de plúmula, determina longitudes similares cuando se utilizó semilla con 42 y 63 días de almacenamiento, presentando una mayor longitud cuando se utilizó semilla almacenada por 21 días que estadísticamente es significativa, con respecto a los dos restantes tratamientos como muestra la figura 18.

El proceso de deterioro producto del almacenamiento de la semilla, se pone de manifiesto en la reducción de las actividades metabólicas<sup>13</sup> : reanudación de la síntesis proteica, movilización de las reservas y biosíntesis de energía.

-----

<sup>13</sup> Complejo de fenómenos físico-químicos que ocurren en la planta en virtud de los cuales se llega a sintetizar, en una serie de procesos anabólicos, los diversos cuerpos que integran el organismo, al paso que, por otra parte, y de manera , catabólica , la materia es degradada.



**Figura 18. Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la longitud de plúmula**

El comportamiento en esta prueba es similar al observado en la prueba de la radícula, es decir se encontró una disminución gradual en la longitud de la plúmula conforme el tiempo de almacenamiento de la semilla aumenta.

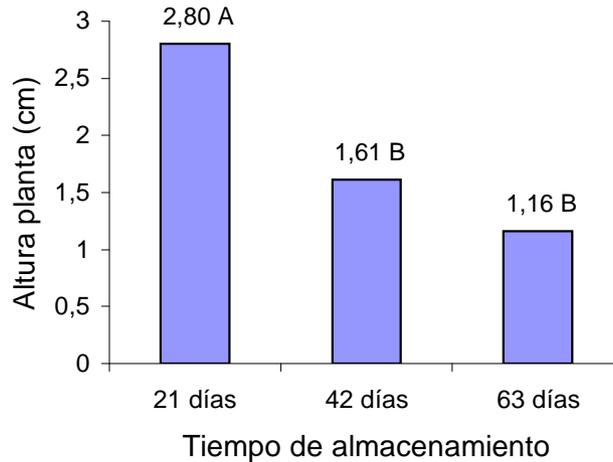
#### 4.2.6 Altura de plántula 35 días después de la siembra (DDS)

La evaluación en la altura de las plántulas a los 35 DDS presentó una disminución al utilizar semillas con diferencias en su calidad fisiológica producto del almacenamiento.

**Cuadro 23. Análisis de varianza para efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la altura de plántula a los 35 DDS**

Fuente	GL	SC	CM	F	Pr $\geq$ F
Bloque	2	0.050422	0.025211	0.27	0.77
Tiempo de almacenamiento	2	4.280422	2.140211	22.84	0.0065
Error	4	0.374844	0.093711		
Total	8	4.705688			

#### 4.2.6.1 Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla



**Figura 19. Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla sobre la altura de plántula 35 DDS**

A los 35 DDS (figura 19) la altura de las plántulas obtenidas con semillas con 42 y 63 días de almacenamiento fue similar, no presentaron diferencias significativas, no sucediendo lo mismo con las plántulas obtenidas con 21 días de almacenamiento, cuya altura fue significativamente superior.

La altura de plántula a los 35 DDS marca una tendencia a disminuir conforme el tiempo de almacenamiento aumenta, esto puede explicarse ya que las plantas originadas a partir de semillas con diferencias en la calidad fisiológica, tiene un desarrollo inicial lento. Esto coincide con lo observado por Carvalho y Toledo (1978), en semilla de maní.

El principal evento metabólico que es afectado en la semilla germinada es la hidrólisis de las proteínas de reserva que provee a la plántula en crecimiento los nutrientes necesarios antes que comience a fotosintetizar (Salinas *et al.*, 2001).

Esto es especialmente crítico cuando se trata de semillas tan pequeñas como de la estevia, ya que se atribuye a que estas poseen materiales de reservas limitados, que se agotan rápidamente después de iniciada la germinación.

Así se explica por que a medida que el tiempo de almacenamiento de la semilla es mayor el deterioro es mayor afectando al normal desarrollo de las actividades metabólicas que se traduce en la disminución del crecimiento de la plántula .

#### 4.2.7 Número de plántulas

**Cuadro 24. Análisis de varianza para efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla en el número de plántulas**

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Pr ≥ F</b>
Bloque	2	342.0	171.0	0.22	0.81
Tiempo de almacenamiento	2	122954.0	61477	78.12	0.0006
Error	4	3148.0	7.87		
Total	8				

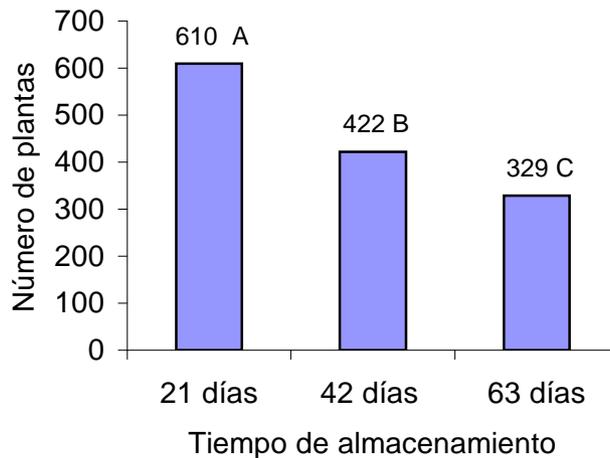
El número de plántulas obtenidas por tratamiento demuestra la importancia del uso de semilla de alta calidad fisiológica.

##### 4.2.7.1 Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla

La diferencia en el número de plántulas obtenidas demuestra que se trabajó con semilla con diferencias fisiológicas producto del almacenamiento. La prueba de Duncan, determina que todos los valores fueron significativamente diferentes.

También se observa que el mayor número de plántulas se obtuvo cuando se utilizó semilla con 21 días de almacenamiento (610 plántulas). El menor número

de plántulas se obtuvo cuando se utilizó semilla con 63 días de almacenamiento (329 plántulas) como muestra la figura 20.



**Figura 20. Efecto del tiempo de almacenamiento de la semilla en el número de plántulas**

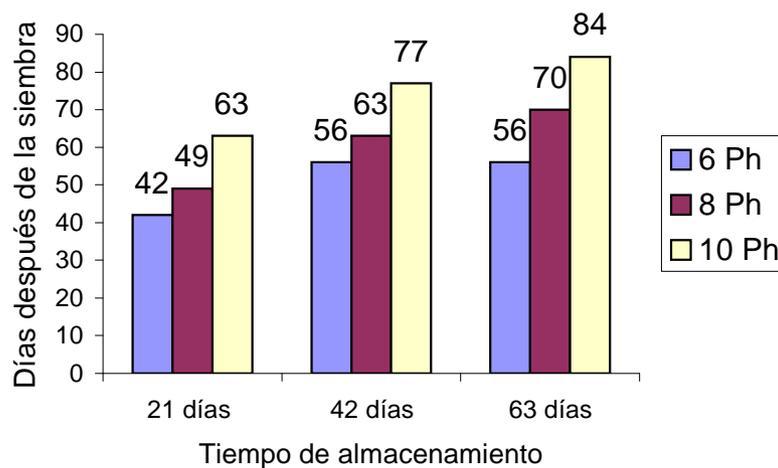
El ensayo permite observar una reducción del número de plántulas en un 30.8 % cuando se utilizó semilla almacenada por 42 días y un 46.1 % de reducción cuando se utilizó semilla almacenada por 63 días .

El número de plántulas obtenidas, es el resultado en primera instancia del comportamiento de las semillas en el porcentaje de emergencia, que como efecto de los tiempos de exposición a las condiciones de almacenamiento adversas ya presentaban diferencias apreciables y en segunda instancia la capacidad de la plántula a establecerse bajo una amplia gama de condiciones ambientales disminuye, que coincide con Peñaloza, (2001), que manifiesta que el almacenaje prolongado induce diferentes defectos sobre las nuevas plántulas, disminuyendo el número de ellas en campo.

### 4.3 Campo

#### 4.3.1 Determinación de los estados fisiológicos en el momento del transplante

Para esta variable los rangos de variación en días fueron de 42 a 56 para que las plántulas alcancen el estado fisiológico de 6 pares de hojas, homogéneos en los dos últimos tiempos de almacenamiento de la semilla (42 y 63 días). Los rangos de variación para que las plántulas alcancen los estados fisiológicos de 8 pares de hojas fueron de 49 a 70 días, heterogéneos para los tres tiempos de almacenamiento. Finalmente para alcanzar los 10 pares de hojas el rango de variación fue de 63 a 84 días como muestra la figura 21.



**Figura 21. Determinación de los estados fisiológicos en el momento del transplante por tiempos de almacenamiento de la semilla**

La figura 21, permite apreciar que, conforme el tiempo de almacenamiento de la semilla aumenta los días para alcanzar los estados fisiológicos deseados también aumentan y es más evidente con la semilla almacenada por 42 y 63 días, este evento se puede atribuir a los daños en los mecanismos energéticos y que se traducen en la velocidad y uniformidad de crecimiento de las plántulas que disminuyen (Barboza y Herrera, 1990).

### 4.3.2 Análisis de varianza de las variables de respuesta

A continuación se presentan los cuadrados medios (varianzas), de las variables de respuesta para los diferentes efectos, donde se observa que los coeficientes de variación son de magnitud aceptable.

**Cuadro 25. Cuadrados medios para las variables de respuesta**

Fuente de variación	GL	Porcentaje de prendimiento	Altura de planta(cm)	Diámetro (cm)
Bloque	2	12.9295 ns	103.3781*	0.3508**
Estado Fisiol. al transpl.	2	349.3703**	43.5140ns	0.5857**
Bloque * estado Fisiol.	4			
Tiempo de almacenamiento	2	38.0370**	121.9402**	19.95**
Estado Fisiol.*Tiem. de alm.	4	4.592 ns	10.0820 ns	0.23 ns
Error	12			
Total	26			
Coeficiente de variación		1.70	10.88	7.87

\* Significativo al nivel del 5 %

\*\* Altamente significativo al nivel del 1 %

ns No significativo

De acuerdo al análisis de varianza presentado en el cuadro 25 se puede determinar que existen diferencias significativas entre tiempos de almacenamiento de la semilla para las tres variables de respuesta, lo que nos sugiere que las plántulas obtenidas con semillas almacenadas presentan diferencias morfológicas una vez establecidos en el lugar definitivo.

El análisis de varianza también nos permite determinar que se presentaron diferencias significativas para los diferentes estados fisiológicos en el momento del transplante de las plántulas para las variables de respuesta porcentaje de prendimiento, diámetro de tallo y no significativa para la variable de respuesta altura de planta. También cabe recalcar que no se encontraron diferencias significativas para la Interacción estado fisiológico en el momento del transplante \* tiempo de almacenamiento de la semilla para todas las variables de respuesta.

### 4.3.3 Porcentaje de prendimiento

En el cuadro 26 se aprecian efectos significativos de los factores principales estados fisiológicos en el momento del trasplante y tiempo de almacenamiento de la semilla en el porcentaje de prendimiento, no sucediendo lo mismo para la interacción entre ambos factores donde no se presentó significación estadística, para un mejor análisis se realizaron las pruebas de medias correspondientes.

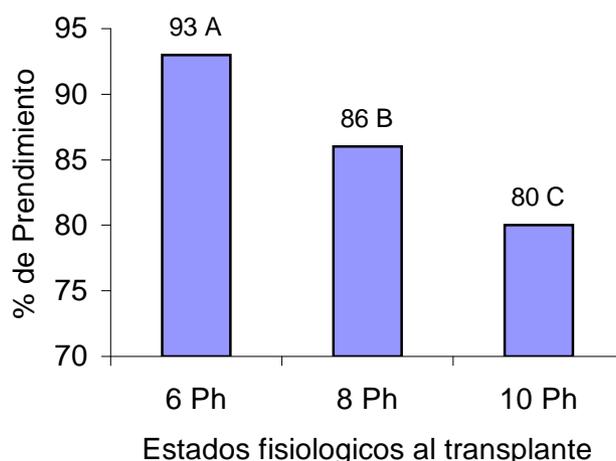
**Cuadro 26. Análisis de varianza para el porcentaje de prendimiento**

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Pr <math>\geq</math> F</b>
Bloque	2	25.851	12.9295	1.41	0.34
Estado Fisiol. al transpl.	2	698.74	349.3703	38.19	0.0025
Bloque * estado Fisiol.	4	<b>36.59</b>	9.1481	4.19	0.0238
Tiempo de almacenamiento	2	76.074	38.03703	17.41	0.00030
Estado Fisiol.*Tiemp. de alm.	4	18.376	4.592	2.10	0.1435
Error	12	26.22			
Total	26	881.88			

#### 4.3.3.1 Discriminación de medias entre estados fisiológicos en el momento del trasplante

En la figura 22 la prueba de rango múltiple de Duncan, indica que existen diferencias entre las plántulas con un estado fisiológico de 6 pares de hojas con 93 % de prendimiento y los dos estados fisiológicos en estudio 8 y 10 pares de hojas con porcentajes de prendimiento de 86 y 80 respectivamente.

Así también se determinó que existen diferencias estadísticas en el porcentaje de prendimiento de las plántulas con estados fisiológicos de 8 y 10 pares de hojas.



**Figura 22. % de prendimiento para estados fisiológicos en el momento del trasplante**

El éxito en el prendimiento, depende de la capacidad de la plántula para superar el “shock”, de cómo soportan los cambios estructurales y funcionales de la raíz, que esta determinada, por la capacidad radicular de absorción de agua, nutrientes y la capacidad de regeneración de nuevas raíces (Hoyos,1996).

La plántula una vez en el lugar definitivo tendrá que realizar dos actividades vitales: absorber agua y nutrientes para en primera instancia reanudar sus actividades fisiológicas vitales (fotosíntesis), ya que los fotosintatos producidos constituyen un factor de producción de las nuevas raíces y segundo absorber el agua para recuperar la perdida por efecto de la transpiración<sup>14</sup> (Krauz,1942). La plántula debe estar preparado para cumplir estas dos actividades ya que de lo contrario el déficit hídrico se ve agravado aumentando las posibilidades del marchitamiento<sup>15</sup> y / o muerte de la plántula.

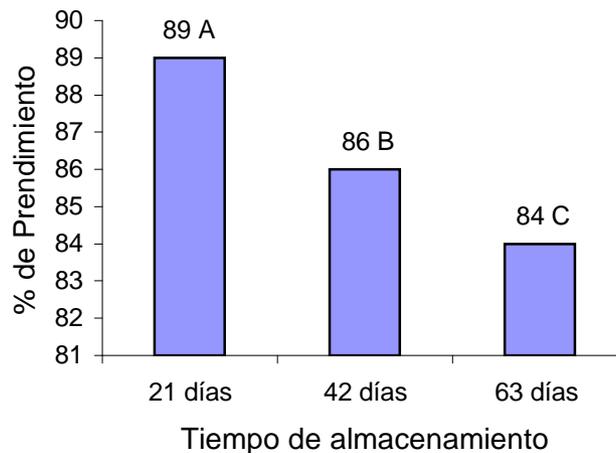
-----  
<sup>14</sup> Proceso de perdida de agua en la vegetación causado por la evaporación de agua en la superficie de las hojas.

<sup>15</sup> Caída de las hojas y los tallos verdes debido a que la velocidad de evaporación del agua de las hojas es mayor que la velocidad de absorción de agua de las raíces.

Entonces así se puede explicar que las plántulas con 6 pares de hojas por tener menor superficie foliar y por ende menor transpiración tuvieron la capacidad de reanudar sus actividades vitales con menor dificultad que las plántulas de los restantes estados fisiológicos. Bajo la misma lógica se puede explicar el menor porcentaje de prendimiento de las plántulas de 10 pares de hojas.

#### 4.3.3.2 Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla

La prueba de Duncan, permite determinar diferencias en el porcentaje de prendimiento de las plántulas como efecto de la utilización de semilla almacenada. Así podemos afirmar que las plántulas obtenidas de semilla con 21 días de almacenamiento presentan un 89 % de prendimiento, que estadísticamente es superior a las plántulas obtenidas con semilla almacenada por 42 y 63 días, que presentan valores de porcentaje de prendimiento de 86 y 84 respectivamente como muestra la figura 23.



**Figura 23. % de prendimiento para tiempos de almacenamiento de la semilla**

En esta fase la plántula depende exclusivamente de la capacidad radicular de absorción de agua y nutrientes. El almacenamiento de la semilla provoca daños

en la maquinaria metabólica de la plántula y que se reflejan en primera instancia en un pobre desarrollo radicular. La absorción de agua y nutrientes se ven seriamente afectadas ya que esta actividad requiere un gasto de energía metabólica, la que es obtenida a partir de la respiración. El deterioro repercutirá en menores tasa de absorción de oxígeno y comúnmente una menor intensidad respiratoria lo que significa una menor formación de ATP, si recordamos que la conversión oxígeno – ATP se ve seriamente afectada casi a menos de la mitad de su eficiencia producto del almacenamiento de la semilla (Bewley y Black,1994).

La reducción en la producción de energía (ATP), condiciona en primera instancia un retraso en las actividades metabólicas ya que los efectos del deterioro son menores al grado en que sus actividades vitales no han sido reducida significativamente, pero a medida que el deterioro es mayor presenta un efecto pronunciado. El retraso en las actividades metabólicas significa mayor exposición de la plántula al “shock” del transplante y será mayor conforme mayor sea el deterioro .

Entonces así se puede explicar que las plántulas producto de semilla almacenada por 21 días tuvo un mayor porcentaje de prendimiento. Bajo la misma lógica se puede explicar el menor porcentaje de prendimiento de las plántulas obtenidas a partir de semilla almacenada por 63 días.

#### 4.3.4 Altura de planta

**Cuadro 27. Análisis de varianza para altura de planta**

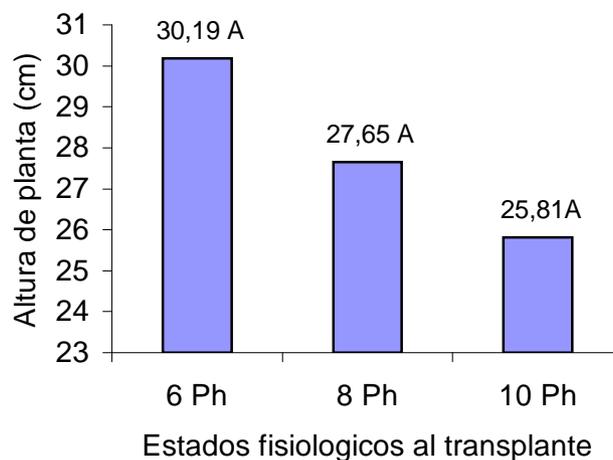
<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>Pr ≥ F</b>
Bloque	2	206.7562	103.3781	7.41	0.0452
Estado Fisiol. Al transpl.	2	87.0280	43.5140	3.12	0.1526
Bloque * estado Fisiol.	4	<b>55.8014</b>	13.9503	1.51	0.2599
Tiempo de almacenamiento	2	243.8804	121.9402	13.22	0.0009
Estado Fisiol.* Tiemp. de alm.	4	40.3283	10.0820	1.09	0.4034
Error	12	110.660	9.2216		
Total	26	744.45			

Para la variable de respuesta altura de planta, el análisis estadístico define diferencias no significativa entre estados fisiológicos en el momento del transplante y diferencias significativas entre tiempos de almacenamiento de la semilla. La interacción de los factores indica diferencia no significativa.

#### 4.3.4.1 Discriminación de medias entre estados fisiológicos en el momento del transplante

En la figura 24 se aprecian promedios de las alturas de las plantas, transplantadas a 3 edades fisiológicas distintas en el lugar definitivo, la prueba de Duncan declara que no se hallan diferencias estadísticas, siendo el rango de variación de 30.1 cm a 25.8 cm para la variable de respuesta, que no es afectado por los estados fisiológicos con que fueron transplantados en el lugar definitivo.

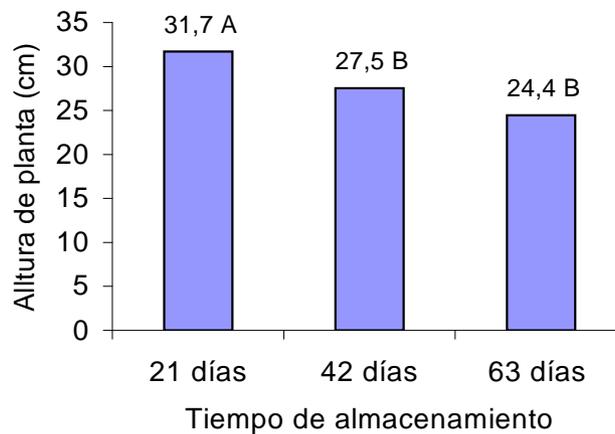
Este evento puede explicarse en el sentido de que las plantas, si bien tiene un desarrollo inicial lento, con condiciones climáticas adecuadas pueden alcanzar una altura similar a las plantas originadas por semillas frescas (Carvalho y Toledo, 1978).



**Figura 24. Altura de planta para estados fisiológicos en el momento del transplante**

#### 4.3.4.2 Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla

La prueba de significación de Duncan, determina que la altura de las plantas obtenidas con semilla almacenada por 21 días (31.752 cm) es significativamente mayor a la altura de las plantas obtenidas con semilla almacenada por 42 días (27.49 cm) y 63 días (25.81 cm) respectivamente. Así también define que no existe diferencias significativas entre la altura de las plantas obtenidas con semilla almacenada por 42 y 63 días.



**Figura 25 . Altura de planta para tiempos de almacenamiento de la semilla**

La utilización de semilla almacenada tuvo un efecto marcado sobre la altura de las plantas. Se observa una reducción en la altura de las plantas conforme el tiempo de almacenamiento de la semilla aumenta. Este evento puede ser explicado desde dos puntos de vista :

##### a) Celular

Armas *et al.*, (1990) sostiene que el crecimiento de una planta se debe a un aumento en altura y diámetro que es el resultado de la división y el alargamiento celular.

La pérdida de la capacidad para la división celular puede ser una consecuencia del proceso de envejecimiento, como una causa de ello, encontrando que células jóvenes eran capaces de aproximadamente 50 divisiones celulares y células envejecidas cerca de 30 divisiones.

El almacenamiento de la semilla en condiciones adversas ocasiona el envejecimiento de la misma (envejecimiento celular). Entonces cuanto mas tiempo esta expuesta la semilla a las condiciones adversas mayor será el envejecimiento de la misma. Así podemos explicar el por que las plantas obtenidas con semilla sometidas a 21 días de almacenamiento presenta la mayor altura ya que el tiempo de envejecimiento no es muy marcado.

b) fisiológico

Las diferencias en la altura de las plantas, determina que la utilización de semilla de baja calidad fisiológica determinara la obtención de plantas de similares características. Las plantas resultantes sufren daños en las actividades vitales (Peñaloza,2001) y si como sostiene Leskovar, (2001) los dos procesos vitales que determinan el crecimiento del transplante una vez establecido en el lugar definitivo son la fotosíntesis y la respiración (Leskovar,2001) se explica las diferencias encontradas.

4.3.5 Diámetro de tallo

**Cuadro 28. Análisis de varianza para el diámetro de tallo**

Fuente	GL	SC	CM	F	Pr ≥ F
Bloque	2	0.7016	0.3508	21.59	0.0072
Estado Fisiol. al transpl.	2	1.1715	0.5857	36.04	0.0027
Bloque * estado Fisiol.	4	<b>0.0650</b>	0.0162	0.28	0.8853
Tiempo de almacenamiento	2	2.3161	1.1580	19.95	0.0002
Estado Fisiol.*Tiemp. de alm.	4	0.0525	0.0131	0.23	0.9181
Error	12	0.6964	0.0580		
Total	26				

El análisis de fuentes de variación del cuadro 28 muestra que tanto el estado fisiológico al transplante y los tiempos de almacenamiento de la semilla influyen directamente sobre el diámetro del tallo de la planta, mostrando diferencias. Lo que sugiere que el desarrollo y crecimiento del transplante una vez establecido a campo depende de su edad fisiológica y la calidad fisiológica de la semilla.

#### **4.3.5.1 Discriminación de medias entre estados fisiológicos en el momento del transplante**

Mediante la prueba de Duncan se determinó que de los 3 estados fisiológicos en el momento del transplante, el estado fisiológico de 6 pares de hojas fue el que obtuvo el mayor diámetro de tallo (3.32 mm) que estadísticamente es superior a los valores obtenidos de los 2 estados fisiológicos restantes.

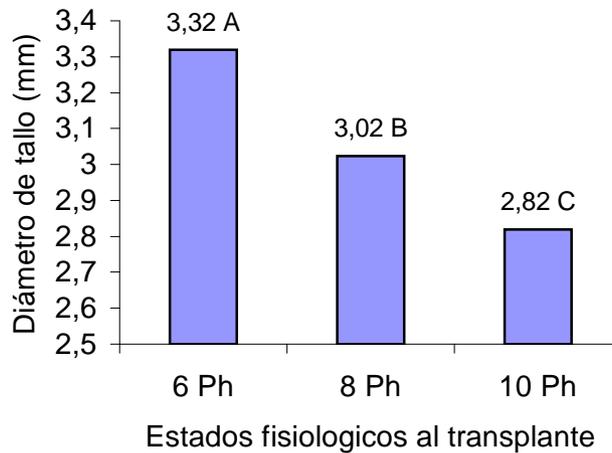
El mejor indicador del “stress” post transplante, es la propia planta a través de cambios morfológicos asociados a este evento, entre ellos:

- Estrechamiento del tallo

El mayor diámetro se observó en los tallos de las plantas que fueron transplantados con un estado fisiológico de 6 pares de hojas (3.32 mm) que es un estado fisiológico relativamente joven (51 días después de la siembra) como afirma Candeira (2002), que coincide con el periodo de mayor absorción y de máximo crecimiento.

Esta afirmación nos sugiere que la planta se encuentra en un estado de crecimiento activo lo que implica la predominancia de tejidos meristemáticos con predominancia de células pequeñas.

En general las células pequeñas son más resistentes a la deshidratación ya que poseen vacuolas pequeñas. Las vacuolas relativamente pequeñas tienen menor cantidad de agua para perder, evitando así que el protoplasto sea sometido a tensiones mecánicas muy fuertes (Rodríguez,1991).



**Figura 26. Diámetro de tallo para estados fisiológicos en el momento del trasplante**

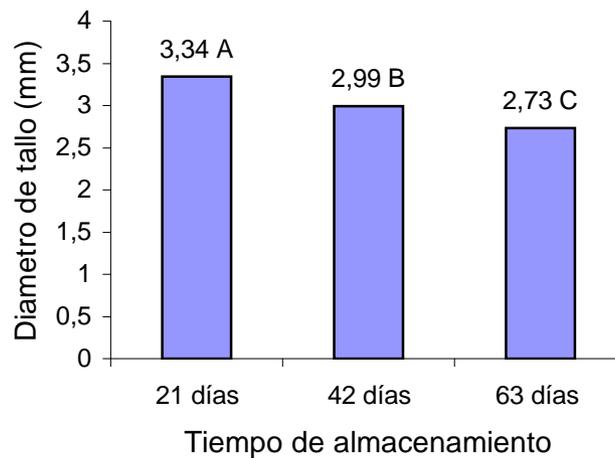
Bajo esa lógica se asume que los trasplantes de 6 pares de hojas, resistieron de mejor forma el “shock”, del trasplante y fueron capaces de en primera instancia continuar rápidamente su crecimiento radicular y disminuir el lapso de tiempo de exposición al “shock”, para en segunda instancia retomar su crecimiento vegetativo, y así poder alcanzar el potencial máximo de productividad(Leskovar,2001).

Así también podemos explicar por que los trasplantes de 10 pares de hojas presentan el menor diámetro de los tratamientos (2.82 mm).

La tendencia hallada en el ensayo coincide con lo que manifiesta Edmon *et al.*,(1976) que señala que a mayor tamaño o edad de trasplante, menor es la habilidad de las plantas para recuperarse del paro en el crecimiento ocasionado por el mismo.

#### 4.3.5.2 Discriminación de medias entre tiempos de almacenamiento de la semilla

La figura 27, muestra el diámetro de los tallos en los tratamientos, donde se observa una reducción en el diámetro de tallo de las plantas obtenidas con semilla con 42 y 63 días de almacenamiento, que estadísticamente es significativa con respecto al diámetro de los tallos de las plantas obtenidas con semilla almacenada por 21 días.



**Figura 27. Diámetro de tallo para tiempos de almacenamiento de la semilla**

La utilización de semilla almacenada tuvo un efecto marcado sobre el diámetro de las plantas. Se observa una reducción en el diámetro de las plantas conforme el tiempo de almacenamiento de la semilla aumenta. Este evento puede ser explicado desde dos puntos de vista :

#### c) Celular

Armas *et al.*, (1990) sostiene que el crecimiento de una planta se debe a un aumento en altura y diámetro y es el resultado de la división y el alargamiento celular.

La pérdida de la capacidad para la división celular puede ser una consecuencia del proceso de envejecimiento, como una causa de ello, encontrando que células jóvenes eran capaces de aproximadamente 50 divisiones celulares y células envejecidas cerca de 30 divisiones.

El almacenamiento de la semilla en condiciones adversas ocasiona el envejecimiento de la misma(envejecimiento celular). Entonces cuanto mas tiempo esta expuesta la semilla a las condiciones adversas mayor será el envejecimiento de la misma. Así podemos explicar el por que las plantas obtenidas con semilla sometidas a 21 días de almacenamiento presenta la mayor diámetro ya que el tiempo de envejecimiento no es muy marcado.

#### d) fisiológico

Las diferencias en el diámetro de las plantas, determina que la utilización de semilla de baja calidad fisiológica determinara la obtención de plantas de similares características. Las plantas resultantes sufren daños en las actividades vitales (Peñaloza,2001) y si como sostiene Leskovar, (2001) los dos procesos vitales que determinan el crecimiento del transplante una vez establecido en el lugar definitivo son la fotosíntesis y la respiración (Leskovar,2001) se explica las diferencias encontradas.

La diferencias muestra que la calidad fisiológica de la semilla repercute en la intensidad de las actividades vitales de los transplantes obtenidos (Peñaloza,2001). Si los dos procesos vitales que determinan el crecimiento del transplante una vez establecido en el lugar definitivo son la fotosíntesis y la respiración (Leskovar,2001).

## **5. CONCLUSIONES**

De acuerdo a los objetivos planteados y resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se realizaron las siguientes conclusiones:

### **5.1 Conclusiones generales**

La semilla resulta ser la piedra fundamental del proceso productivo agrícola, los resultados obtenidos en la investigación corroboran tal afirmación.

En la localidad de Caranavi, el almacenamiento de la semilla es un tema de poca o nula investigación, siendo parte fundamental de las causas de los bajos rendimientos en los diferentes cultivos. La escasa información sobre la producción de semillas (beneficio y almacenamiento) hacen que estas actividades sean realizadas por el agricultor de forma empírica y con muchas deficiencias que tiene como efecto la producción de semilla de baja calidad.

### **5.2 Laboratorio**

#### **5.2.1 Caracterización físico biológica de la semilla**

La presencia de materia inerte, ramas, hojas y tierra, producto del mal manejo y beneficio de la semilla son aspectos que definen el bajo porcentaje de pureza de la semilla estudiada 8 %.

El peso de 1000 semillas que presenta un valor de 0.24 g determina que el material vegetal posee características importantes con relación al peso de la semilla del lugar de origen (0.25g) .

El contenido de humedad de la semilla en el momento de almacenamiento, es uno de los factores del rápido deterioro de la semilla.

La viabilidad se reduce drásticamente de un 7.6 % a 0.6 % después de 63 días de almacenamiento de la semilla.

El valor del porcentaje de germinación al inicio de la prueba fue de 5.5 % llegando a los 63 días a un 0.5 % . El inicio de la germinación se dio a los 3 días finalizando el 6 día .

La relación entre la viabilidad y la germinación muestra que existe una disminución entre la germinación potencial ( viabilidad ) con relación a la germinación real de 27 % a los "0" días, 16 % a los 21 días, 3% a los 42 días y 17 % a los 63 días de almacenamiento de la semilla.

La relación deterioro y germinación determina una relación inversamente proporcional a medida que el tiempo de almacenamiento es mayor el deterioro se incrementa y el porcentaje de germinación disminuye .

El vigor se vio fuertemente afectado por el almacenamiento de la semilla de un 36.3 % al inicio de la prueba a 4.54 % al final de la prueba.

### **5.2.2 Prueba de germinación**

Se rechaza la primera hipótesis planteada ya que el almacenamiento de la semilla tiene un efecto marcado en la prueba de germinación.

El porcentaje de germinación decae rápidamente con la edad de la semilla, es así que la semilla almacenada por 0 días presenta un 5.5 % de germinación y la semilla con 63 días 0.5 % de germinación.

Se obtuvo una mayor tasa de germinación en los primeros días de almacenamiento ( 0.22 ) sin embargo a los 63 días de almacenamiento de la semilla, la tasa se reduce a 0.03.

### 5.3 Almacigo

Se rechaza la segunda hipótesis planteada ya que el almacenamiento de la semilla tiene un efecto muy marcado en la propagación de la estevia en almacigo.

Con respecto a las variables de respuesta porcentaje de germinación y tasa de germinación, estos fueron influenciados negativamente por los tiempos de almacenamiento de la semilla, es así que a mayor tiempo de almacenamiento de la semilla el porcentaje de germinación se reduce de 4.33 % a 1.67 % , y la tasa de germinación de 0.23 a 0.09 después de 63 días de almacenamiento de la semilla.

La longitud de radícula y especialmente de plúmula ponen de manifiesto que se logro trabajar con semillas que presentaban diferencias en su calidad fisiológica como efecto del almacenamiento de la semilla. La longitud de la plúmula y la radícula disminuyen después de 63 días de almacenamiento de la semilla de 2.33 a 0.76 cm y 0.71 a 0.43 cm respectivamente.

Se presentaron diferencias en la altura de las plántulas a los 35 días de realizada la siembra, siendo las plántulas obtenidas con 21 días de almacenamiento de la semilla las que presentaron mayor altura(2.80 cm) y las de menor altura las plántulas obtenidas con semilla almacenada por 63 días (1.16 cm).

La semilla con mayor tiempo de almacenamiento (63 días) origino un menor número de plántulas(610 plántulas), esta tendencia es normal conforme decrece la calidad fisiológica de las semillas.

## 5.4 Campo

Los resultados obtenidos nos indican que los estados fisiológicos en el momento del transplante tienen efecto en el momento del transplante por lo que se rechaza la tercera hipótesis planteada.

Los resultados obtenidos indican que tanto los estados fisiológicos en el momento del transplante y los tiempos de almacenamiento de la semilla afectan en forma variable al porcentaje de prendimiento.

El estado fisiológico que presentó el mayor porcentaje de prendimiento en campo fue el de 6 pares de hojas (93 %) y el menor porcentaje se observó en el estado fisiológico de 10 pares de hojas (80%).

El almacenamiento de la semilla tuvo un efecto marcado en las plantas originadas de estas, siendo la semilla con 21 días de almacenada la que originó plantas con mejores características y por ende mayor prendimiento en campo (89%).

El crecimiento (altura) de la planta una vez establecido en campo depende del tiempo de almacenamiento de la semilla y no así de la edad de la plántula en el momento del transplante.

En el diámetro de tallo se presentaron diferencias, las plantas establecidos con 6 pares de hojas presentaron mayor diámetro (3.32 mm) que los de 8 y 10 pares de hojas. El diámetro también depende de los tiempos de almacenamiento de la semilla, donde las plantas originadas con semilla con 21 días de almacenamiento fueron las que lograron los mayores diámetros (3.34 mm).

## **6. RECOMENDACIONES**

El presente trabajo de investigación, debido a la escasa información existente, es uno de los pocos desarrollados en la región, por lo cual se permite dar las siguientes recomendaciones:

En el presente trabajo debido a lo extenso del mismo no se enfocó en temas más específicos del almacenamiento, por tanto, se recomienda realizar estudios sobre el efecto del contenido de la humedad de la semilla y temperaturas de almacenamiento.

Realizar investigaciones acerca de métodos de cosecha, secado y beneficiado de la semilla.

Se recomienda realizar estudios complementarios sobre la prueba de viabilidad.

Realizar pruebas acerca del efecto de la temperatura en la germinación, ya que esta actúa como factor determinante de las velocidades de las reacciones metabólicas.

En la actualidad el parámetro del porcentaje de germinación a quedado obsoleto y no da una representación correcta del comportamiento de la semilla en campo, por lo que se recomienda realizar las pruebas de vigor.

Realizar investigaciones acerca de la fisiología del transplante agrícola y probar edades cronológicas en el momento del transplante.

Probar tipos de acondicionamiento como medidas de adaptación de los trasplantes al shock, para garantizar una adecuada respuesta en la operación de transplante.

Realizar pruebas complementarias que abarquen la medición de los rendimientos como efecto de la edad del transplante.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

AGUILERA, H.; GOLDBACH, H. 1980. Storage of coffee (*Coffea arabica* L.) Seed . Joournal of Seed Technology 5 (2) : pp. 7 – 12.

AGUIRRE R. 1992 Manual para el beneficio de Semillas. CIAT, Segunda Edición pp.10.

ALIZAGA, R. 1989. Avalicao de teste de vigor em sementes de feijao e sus relacoes com a emergencia a campo. Tesis M.Sc. Rió Grande do Sul , Universidade Federal de Pelotas, Facultad de Agronomía. pp. 62.

ALDHOS, 1972. Guía para la manipulación de Semillas Forestales . Estudio FAO. Montes N ° 20/2. Roma. pp. 137 .

ANGELUCCI, E. 1986. Adocantes edulcorantes. In : SEMINARIO BRASILEIRO SOBRE *Stevia rebaudiana* (Bert.). Bertoni 3, Campinas. pp. 1 – 2 .

ASSOCIATION OF OFICIAL SEED ANALYSTS (AOSA). 1983. Seed vigour testing Handbook. Contribución N° 32 to the handbook on seed testing. pp. 88.

ARISTA, M. & TALAVERA, S.; 1996. Density effect of the fruit-set, seed crop viability and seedling vigor of *Abies pinsapo*. Annals of Botany. pp. 77- 187-192.

ARMAS, R.; ORTEGA, E. y RODES, R. 1990. Fisiología Vegetal . Editorial Pueblo y Educación . Ciudad de la Habana – Cuba. pp. 247- 301.

- AZCON - BIETO, J. y TALON, M.; 1993. Fisiología y Bioquímica Vegetal. Editorial Mc Graw Hill Interamericana de España. Primera edición Impreso en español. pp. 419 – 432.
- BARBOZA , R. ; HERRERA, J. ; 1990. El vigor en la semilla de café y su relación con la temperatura de secado, el contenido de humedad y las condiciones de almacenamiento. Agronomía Costarricense. (14) 1: pp. 3.
- BERTONHA, A. 1986. Informaciones Básicas sobre la *Stevia rebaudiana* Bert. Magna Paraná Brasil pp. 25.
- BEWLEY, J. D.; BLACK; M. 1994. Sedes: Physiology of development and germinación. 2 ed. Plenum Press, New York. pp. 445 .
- BONIFACIO A. Y ESPINDOLA G. 1996. Componentes de un programa de producción de semilla de buena calidad. Catálogo de variedades mejoradas de quinua y recomendaciones para la producción y uso de semilla certificada. Bolivia. pp. 4-5-7.
- CANDEIRA. A. 2002. Informe Técnico Preliminar “ Proyecto de Desarrollo Agroindustrial de la *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni en Bolivia.
- CAÑETA J. B. 1983. Primer Simposio para la Investigación. 3ra Ed. Editorial Jurídica. Lima, Perú. pp. 190.
- CARDOZO. V. 1986. Estudio de posibilidades de desarrollo de la *Stevia Rebaudiana* en el Paraguay. Informa preparado para el Centro Internacional de Comercio GATT/UNCTAD, Asunción, Paraguay. pp. 35.

- CARVALHO, N. M. ; TOLEDO, F. F . 1978. Relationship between available space For plant development and seed vigor in peanuts (*Arachis hipogea*) plant performance. Seed Science and Technology . 6(4): pp. 907 – 910.
- CEPEX. 1982. Ka ´ a He´ e Identificaci3n de Nuevos ´ proyectos de Exportaci3n Ministerio de Industria y Comercio. Serie 33 diciembre. Asunci3n.
- COCHRAN, W. Y COX, G. 1965. Diseños Experimentales . Editorial Trillas 1 Ed. En espaol. M3xico. pp. 328-329.
- DE VARGAS, R. 1980. Informe sobre el viaje a Jap3n para observar la producci3n, comercializaci3n e industrializaci3n de la planta de *Stevia rebaudiana Bertoni*. Asunci3n . Julio.
- DE ACOSTA R. 1997 El contenido de Humedad en semillas forestales . Curso Sobre “ Recolecci3n y procesamiento de semillas forestales” Bolivia. pp. 46-47-48.
- DELOUCHE, J.C. y GADWELL, W.P. 1967, Seed vigor tests. Proceeding of the Association of Official Seed Analists. 50(1) : pp. 124 – 129 .
- DULFUS C. 1980 . Las semillas y sus usos. Distrito Federal, M3xico. pp.88-89.
- EDMON, J. B, L. SEEN y F. S. ANDREWS. 1976. Principios de Horticultura. 3 Ed. Editorial Continental . M3xico. pp.274 – 288 .
- FELIPE. G. 1971. Observacoes a respeito da germinacao de *Stevia rebaudiana* . Bert.

- GUZMAN, M. 2002. Acondicionamiento Nutritivo en Semilleros y Respuesta Postrasplante en Hortalizas. Departamento Producción Vegetal, Universidad de Almeria – España. pp. 2.
- HARTMANN, H y KESTER. 1999. Propagación de Plantas Sexta Reimpresión Compañía Editorial Continental, SA. De CV. México. pp. 137 – 194.
- HARTMANN, F. 1990. Invernaderos y ambientes atemperados . Ed. Ooffsed Bolivia Ltda.. La Paz ,Bolivia. pp. 9 – 30.
- HOYOS, E. P. 1996. Parámetros de calidad en plántulas hortícola. En : II Jornadas sobre semillas y semilleros hortícola. Ed. Dirección General de Producción Agraria 35/96. Congresos y Jornadas. Almeria 29-31 mayo,1995.
- KRAUZ, E. J. 1942. Effect of partial defoliation at transplanting time on Subsequent growth and yield of lettuce, cauliflower, celery, peppers and onion. USDA Technical bulletin 829, pp. 1 – 35.
- INTERNACIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA) 1976, Reglas Internacionales para los Ensayos de semillas. España. pp. 184.
- 1996. International Rules for Saeed Testing. Zurcí, Switzerland. pp. 334.
- JARA F. 1996. Biología de semillas forestales. Revista N ° 36, CATIE. Turrialba, Costa Rica. pp. 15-20.
- JIMÉNEZ. A. 1974. La yerba Dulce Ka ´ a H e ´ e (*Stevia rebaudiana Bert.*), Revista de agricultura Comercio e Industria. Asunción, Paraguay. pp. 25.

- JORDAN. F. 1983. La Propagación de Ka´a he´e , *Stevia rebaudiana* Bertoni  
Primer Simposio Nacional de la Stevia, julio 1983, Asunción – Paraguay  
pp. 29.
- JORDAN. F. 1984. Ka´a He´e (*Stevia rebaudiana Bert.*), Análisis  
Bibliográfico y Anotaciones hortícola . Asunción, Paraguay. pp. 63.
- LESKOVAR. D. 2001 . Producción y Ecofisiología del Transplante Hortícola.
- LI, A. ; HERRERA, J. ; BARBOZA , R. 1996. Efecto del envejecimiento  
Acelerado sobre la germinación y el vigor de la semilla de china sultani  
(*Impatiens wallerana*) en almacigo. Agronomía Costarricense.  
pp.174-179.
- MARCAVILLACA, M. C.; DIVO DE SESAR; M. y VILLELA, F . 1983.  
Propagación Vegetativa a gran escala de Ka´a He´e (*Stevia  
rebaudiana Bert.*): Combinación de micro y macropropagación. Libro de  
actas XVIII.
- MONTEIRO, R. 1981. Taxonomia e biología da reproducao de *Stevia  
rebaudiana* Bertoni. In: SEMINARIO BRASILEIRO SOBRE *Stevia  
rebaudiana* ,Bertoni Campinas. pp. 4.
- MORENO E. 1984. Análisis Físico y Biológico de semillas agrícolas . México.  
pp. 75 - 106-222-250.
- PAJAS. G. 2000. Niveles de fertilización Orgánica En El Cultivo de *Estevia  
(Stevia Rebaudiana Bert.)*, En la Localidad de San Buenaventura. Tesis  
de Ing. Agrónomo. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de  
Agronomía. La Paz, Bolivia.

- PEÑALOZA, P. 2001 . Manual de producción de Semillas de Hortalizas . Ediciones Universitarias Valparaíso de UCV. Valparaíso, Chile. pp.7 – 39.
- PIEDRAHITA, E. 2001. Aumento del Vigor en Semillas de *Pinus patula* (Schlecht. & Cham.) por efecto del Osmocondicionamiento. Vol. 13. pp. 1 – 20.
- PINAYA, A. 1996. Densidades de siembra en el cultivo de Stevia en la localidad de Palos Blancos. Tesis de Ing. Agrónomo. Universidad mayor de San Andrés. Facultad de Agronomía. La Paz, Bolivia.
- PINTO, A.M.R. 1986. Doce stevia : com a instalacao da industria, comeca o cultivo da Stevia . Correio Agro – pecuario, v.26, n.523, pp. 11 –12 .
- PDM ( Plan Municipal de Desarrollo de Caranavi , B.O), 2001. IBIS Consultores Caranavi, La Paz, BO. pp 10 –41.
- RANDL ,F. 1981. Studies on plants Experimental cultivation Agronomy Progress report No 122.
- REYES, P. 1999. Diseños de Experimentos Aplicados. Trillas . Tercera Reimpresión . México DF. México . pp. 348.
- RODRÍGUEZ, M. R. 1991. Fisiología Vegetal . Editorial “ Los Amigos del Libro” Cochabamba – La Paz . pp. 143 – 153.
- SALINAS, A .R.; YOLDJIAN, A . M.; CRAVIOTTO, R. M. ; BIZARRO, V. 2001. Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. Revista Científica Cultural . pp.1176, 1178, 1179.

- SENAMHI (Servicio Nacional de Meteorología e Hidrológica), 2001. Datos Históricos de Temperatura y precipitación.
- SEED NEW. 2002. “La Revista Internacional de Semillas”. Germinación Deterioro y Vigor de Semillas. Publicación Nov / Dic 2002. Disponible en <http://www.Seednews.Inf.br/español/seed86/artigocapa86-esp.Shtml>
- STEVIAPARAGUAY. 2002. “La revista electrónica”. Disponible en <http://www.Steviaparaguay.com>
- SOEJERATO, 1983. Potential Sweetening AGENTS OF PLANT Origin. Testing Stevia species economic botanic. New York . pp. 71 – 79.
- STEEL. R. Y TORRIE. J. 1996. Bioestadística. 2<sup>da</sup> Edición . Editorial McGRAW - HILL Interamericana de México , S.A. DE C. V.
- TAYLOR, J. P., D.B. WESTER, and L. M. SMITH. 1999. Soil disturbance, flood management, and riparian woody planta establishment in the Rió Grande floodplain. Wetlands 19 : pp. 372- 382.
- TRIVIÑO D., T., ACOSTA, R. de & CASTILLO, A. 1990. Técnicas de manejo de semillas para algunas especies forestales neotropicales en Colombia. Bogotá: CONIF, Serie de Documentación No. 19. pp. 91.
- TRUJILLO, E. 1997. Determinación de la calidad física de la semilla . Curso sobre “Recolección y procesamiento de semillas forestales”. Bolivia. pp. 20, 37, 38, 50.

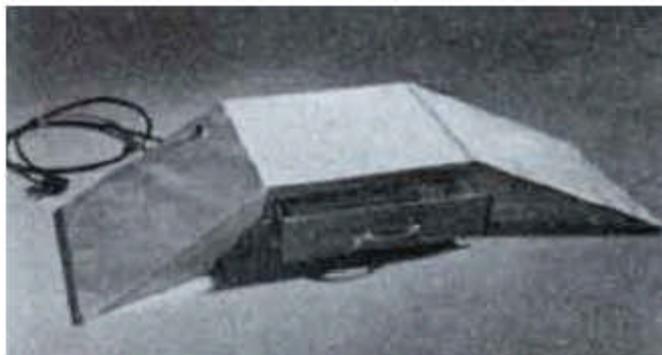
- VIANA. A. 1982. Analise de crescimento a do teos de steviosides em *Stevia rebaudiana Bert.*, em fotoperíodos de 16 a 8 horas. Instituto de Tecnología de alimentos . Sau Paulo.
- WILLAN. R. 1991. Guia para la manipulación de semillas forestales con Especial referencia a los trópicos. Estudio FAO Montes N ° 20/2. Roma . pp. 291- 290.
- WATSON, E. C. 1973 Effect of seed deterioration on performance and yield of Com ( *Zea mays L.* ) Tesis Ph.D. Mississippi State University, Department Of Agronomy. pp. 60 .

# **ANEXOS**

**Anexo 1.** Cámara de germinación



**Anexo 2.** Separador de semillas y materias extrañas para el análisis de pureza



**Anexo 3.** Peso de lote y muestra para el análisis de pureza.

Especie	Peso máximo de la muestra kg	Peso mínimo de la muestra	
		Muestra remitida g	Muestra de trabajo g
Stevia rebaudiana	1000	10	0.5 – 1.0

Fuente : Elaboración propia

**Anexo. 4** Tolerancia para la determinación del peso.

TOLERANCIA			
Coeficiente de variación			
Gramíneas		Demás semillas	
Menor a 6 %	Mayor a 6 %	Menor a 4 %	Mayor a 4 %
	<p>Seria necesario contar y pesar otras ocho repeticiones , determinándose la desviación típica para las 16 observaciones. Se eliminaran las repeticiones cuya diferencia con la media sea superior al doble de la desviación típica</p>	<p>Se puede proceder al calculo del resultado de la determinación</p>	<p>Seria necesario contar y pesar otras ocho repeticiones , determinándose la desviación típica para las 16 observaciones. Se eliminaran las repeticiones cuya diferencia con la media sea superior al doble de la desviación típica</p>

Fuente : ISTA,1976

**Anexo. 5** Tolerancia para la determinación del contenido de humedad

<b>TOLERANCIA</b>	
<b>Coefficiente de variación</b>	
<b>Menor a 0.2%</b>	<b>Mayor a 0.2 %</b>
El resultado será la media aritmética de la doble determinación efectuada sobre la misma muestra	Si excediera se efectuará otra doble determinación

Fuente : ISTA,1976

**Anexo 6.** Partes de la semilla verdadera de la estevia



Corte longitudinal del embrión de la semilla de Stevia rebaudiana (teñida con tetrazolio)

**Anexo 7.** Planilla de resultados para la determinación de la viabilidad

**Muestreado por** : Wilfredo Valle Mamani  
**Muestra** : Semilla de estevia (*Stevia rebaudiana Bert.*)  
**Lugar de Muestreo** : Santa fe de Caranavi  
**Laboratorio** : ORS Oficina Regional de Semillas – La Paz

Tratamiento	Valoración	R1	R2	R3	x
0 días de almacenamiento	<b>Semilla viable</b>	7	8	8	7.6
	<b>Semilla no viable</b>	1	1	0	0.666
	<b>Semilla vana</b>	91	95	88	91.33
	<b>Semilla muerta</b>	1	0	0	0.33
21 días de almacenamiento	<b>Semilla viable</b>	4	4	3	3.66
	<b>Semilla no viable</b>	3	2	3	2.66
	<b>Semilla vana</b>	89	94	93	92
	<b>Semilla muerta</b>	1	2	2	1.66
42 días de almacenamiento					
	<b>Semilla viable</b>	4	1	2	2.3
	<b>Semilla no viable</b>	3	1	3	2.3
	<b>Semilla vana</b>	91	92	95	92.6
	<b>Semilla muerta</b>	3	1	4	2.66
63 días de almacenamiento	<b>Semilla viable</b>	0	1	1	0.66
	<b>Semilla no viable</b>	2	1	1	1.33
	<b>Semilla vana</b>	90	93	95	92.6
	<b>Semilla muerta</b>	7	5	4	5.33

Fuente : Elaboración propia

**Anexo 8.** Descripción de la semilla comercial (fruto) de la estevia



Aquenio pubescente que contiene una semilla, presenta pappus que posee pelos finos que le ayudan a transportarse con el viento, de forma elíptica alargada de 5.4 milímetros de longitud con pappus, 2.7 milímetros de longitud sin pappus y 0.9 milímetros de ancho.

**Anexo 9.** Método para análisis de germinación

<b>Especie</b>	<b>Substrato</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Primer conteo día</b>	<b>Ultimo conteo día</b>
Stevia rebaudiana	Sobre papel (TP)	28 °C	3	10

Fuente : Elaboración propia

## **Anexo 10. Valoración de plántulas normales**

- 1) Un sistema radicular bien desarrollado que incluya una raíz primaria, excepto para aquellas plantas que producen normalmente raíces seminales.
- 2) Un hipocotilo bien desarrollado e intacto y/o un epicotilo sin lesiones en los tejidos conductores y , en las dicotiledóneas, una plúmula normal.
- 3) Un cotiledón para plántulas de monocotiledóneas y dos cotiledones para plántulas dicotiledóneas.

## **Anexo 11. Valoración de plántulas anormales**

- 1) Plántulas dañadas: Plántulas sin cotiledones : plántulas con constricciones : plántulas con hendiduras, grietas o lesiones de las estructuras esenciales las cuales no son ni superficiales ni limitadas en extensión : plántulas sin raíz primaria para aquellas especies en que la raíz primaria es un estructura esencial, excepto para leguminosas de semillas grandes, Zea y todas las especies de Malvaceae y Cucurbitaceae, cuando se hayan desarrollado varias raíces adventicias y laterales lo suficiente como para satisfacer las necesidades de la plántula en el suelo.
- 2) Plántulas deformadas: plántulas con un desarrollo de las estructuras esenciales, débil o desequilibrado, tales como plúmulas , hipocotilos o epicotilos retorcidos en espiral o atrofiados; brotes hinchados y raíces atrofiadas; plúmulas con hendiduras, coleoptilos sin hojas primarias ;plúmulas acuosas y vítreas o en las que el desarrollo se ha detenido posteriormente a la aparición de los cotiledones.
- 3) Plántulas podridas; Plántulas con alguna de las estructuras esenciales afectada por enfermedad o podrida hasta tal punto que se impida el desarrollo normal, excepto cuando sea evidente que el foco de infección no es la semilla de la cual procede.

**Anexo 12.** Planilla de resultados de Porcentaje de germinación

**Muestreado por** : Wilfredo Valle Mamani  
**Muestra** : Semilla de estevia (*Stevia rebaudiana Bert.*)  
**Lugar de Muestreo** : Santa fe de Caranavi  
**Laboratorio** : ORS Oficina Regional de Semillas – La Paz

<b>Tratamiento</b>	<b>Día</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>x</b>	<b>Fac</b>
0 días de almacenamiento	1	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	
	3	1	2	6	0	2.25	2.25
	4	2	1	3	0	1.5	3.75
	5	1	2	0	2	1.25	5.0
	6	0	0	0	2	0.5	5.5
	7	0	0	0	0	0	5.5
	8	0	0	0	0	0	5.5
	9	0	0	0	0	0	5.5
	10	0	0	0	0	0	5.5
21 días de almacenamiento	1	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	
	4	1	1	1	2	1.25	1.25
	5	2	2	0	0	1.0	2.25
	6	0	0	1	0	0.25	2.5
	7	0	0	0	1	0.25	2.75
	8	0	0	1	0	0.25	3.0
	9	0	0	0	0	0	3.0
	10	0	0	0	0	0	3.0
42 días de almacenamiento	1	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	
	5	1	1	1	1	1.0	1.0
	6	1	1	0	0	0.5	1.5
	7	0	0	0	1	0.25	1.75
	8	0	1	0	0	0.25	2.0
	9	0	0	0	0	0	2.0
	10	0	0	0	0	0	2.0

Fuente : Elaboración propia

**Muestreado por** : Wilfredo Valle Mamani  
**Muestra** : Semilla de estevia (*Stevia rebaudiana Bert.*)  
**Lugar de Muestreo** : Santa fe de Caranavi  
**Laboratorio** : ORS Oficina Regional de Semillas – La Paz

Tratamiento	Día	R1	R2	R3	R4	x	Fac
63 días de almacenamiento	1	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	
	6	1	0	0	0	0.25	0.25
	7	0	0	1	0	0.25	0.50
	8	0	0	0	0	0	0.50
	9	0	0	0	0	0	0.50
	10	0	0	0	0	0	0.50

Fuente : Elaboración propia

### Anexo 13. Resumen planilla de resultados de germinación

**Muestreado por** : Wilfredo Valle Mamani  
**Muestra** : Semilla de estevia (*Stevia rebaudiana Bert.*)  
**Lugar de Muestreo** : Santa fe de Caranavi  
**Laboratorio** : ORS Oficina Regional de Semillas – La Paz

Tratamiento	R1	R2	R3	R4	x
0 días de almacenamiento	4	5	9	4	5.5
21 días de almacenamiento	3	3	3	3	3
42 días de almacenamiento	2	3	1	2	2
63 días de almacenamiento	1	0	1	0	0.5

Fuente : Elaboración propia

**Anexo 14.** Planilla de resultados de Porcentaje de germinación

**Muestreado por** : Wilfredo Valle Mamani  
**Muestra** : Semilla de estevia (*Stevia rebaudiana Bert.*)  
**Lugar de Muestreo** : Santa fe de Caranavi  
**Vivero** : ISTAIC Caranavi – La Paz

Tratamiento	Día	R1	R2	R3	x	Fac
21 días de almacenamiento	1	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	
	4	1	2	2	1.67	1.67
	5	1	1	1	1.0	2.67
	6	1	0	0	0.33	3.00
	7	0	1	2	1.0	4.00
	8	0	0	0	0	4.00
	9	0	0	1	0.33	4.33
	10	0	0	0	0	4.33
42 días de almacenamiento	1	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	
	4	2	3	1	2.0	2.0
	5	1	0	1	0.67	2.67
	6	0	0	0	0	2.67
	7	0	0	0	0	2.67
	8	0	0	1	0.33	3.0
	9	0	0	0	0	3.0
	10	0	0	0	0	3.0
63 días de almacenamiento	1	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	
	4	1	0	0	0.33	0.33
	5	0	1	1	0.67	1.0
	6	1	0	0	0.33	1.33
	7	0	0	0	0	1.33
	8	0	1	0	0.33	1.66
	9	0	0	0	0	1.66
	10	0	0	0	0	1.66

Fuente : Elaboración propia

**Anexo 15.** Resumen planilla de resultados de germinación

**Muestreado por** : Wilfredo Valle Mamani  
**Muestra** : Semilla de estevia (*Stevia rebaudiana Bert.*)  
**Lugar de Muestreo** : Santa fe de Caranavi  
**Laboratorio** : ISTAIC Caranavi – La Paz

<b>Tratamiento</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>x</b>
21 días de almacenamiento	3	4	6	4.33
42 días de almacenamiento	3	3	3	3
63 días de almacenamiento	2	2	1	1.66

Fuente : Elaboración propia

**Anexo 16.** Desviaciones máximas admitidas entre repeticiones del ensayo de germinación.

<b>Media de los porcentajes de germinación</b>		<b>Desviaciones máximas admitidas</b>
99	2	5
98	3	6
97	4	7
96	5	8
95	6	9
93 a 94	7 a 8	10
91 a 92	9 a 10	11
89 a 90	11 a 12	12
87 a 88	13 a 14	13
84 a 86	15 a 17	14
81 a 83	18 a 20	15
78 a 80	21 a 23	16
73 a 77	24 a 28	17
67 a 72	29 a 34	18
56 a 66	35 a 45	19
51 a 55	46 a 50	20

La desviación máxima indica la diferencia entre el porcentaje superior e inferior de germinación entre repeticiones. Para hallar el porcentaje medio de las cuatro repeticiones redondear al número entero mas próximo . Localizar la media en el cuadro, luego restar el valor de la media a los cuatro porcentajes de germinación y comparar el valor con la desviación admitida (ISTA,1976).

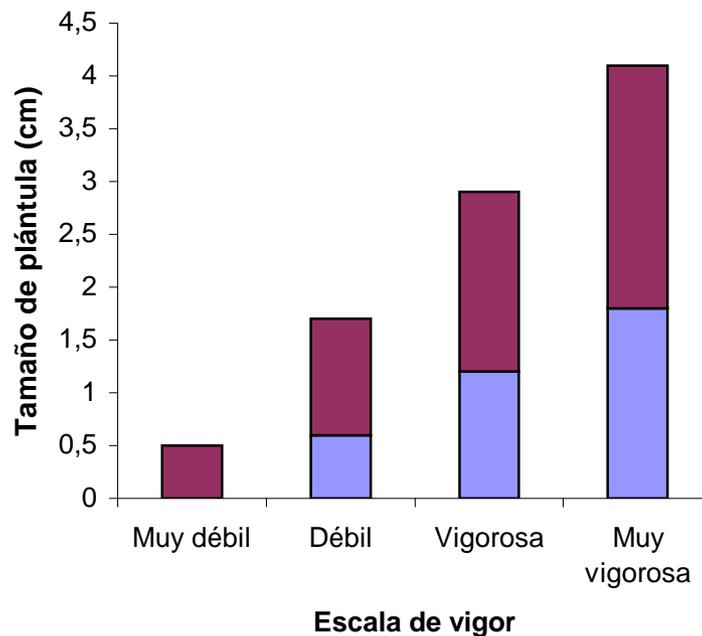
**Anexo 17.** Método para análisis de vigor.

<b>Especie</b>	<b>Substrato</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Primer conteo día</b>	<b>Ultimo conteo día</b>
Stevia rebaudiana	Arena	20 a 25 °C		10

Fuente : Elaboración propia

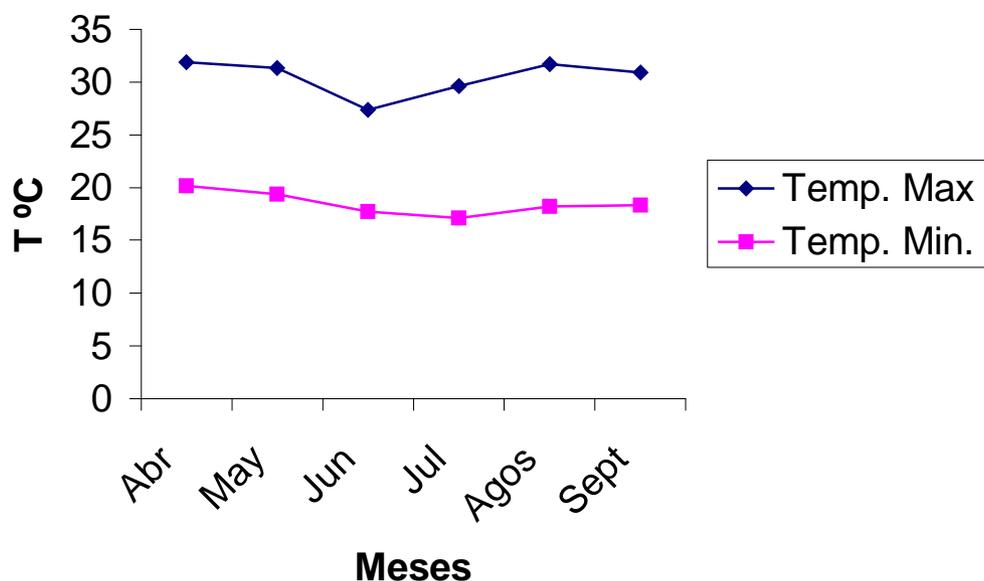
**Anexo 18.** Escala de vigor

<b>Clase</b>	<b>Tamaño</b>
Muy débil	0 a 0.5 cm
Débil	0.6 a 1.1 cm
Vigorosa	1.2 a 1.7 cm
Muy vigorosa	1.8 a 2.3 cm



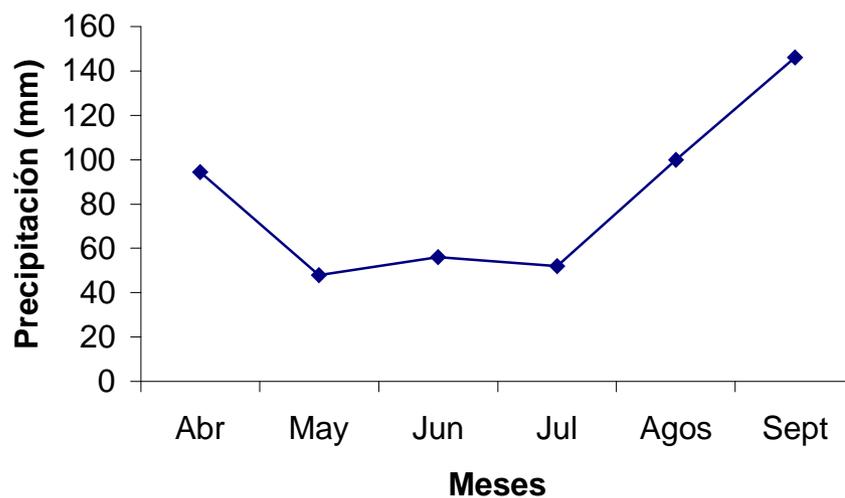
Fuente : Elaboración propia en base a mediciones de plántulas en repeticiones del ensayo de vigor

## Anexo 19. Aspecto climáticos



**Figura 1. Temperaturas máximas y mínimas registradas durante el ensayo**

En la figura 1, se observa que las temperaturas registradas durante el desarrollo del ensayo se encuentran entre los rangos descritos por Pinaya (1996) y Pajas (2000), que mencionan que la estevia se desarrolla muy bien entre los 25 y 35 °C, en tanto que Candeira (2002) indica que la temperatura debe estar entre los 25 y 30 °C, la mínima temperatura fue registrada en el mes de julio con 17.1 °C, y la máxima en el mes de abril con 31.9 °C.



**Figura 2. Precipitaciones registradas durante el ensayo**

La figura 2, muestra que las precipitaciones fueron inferiores a los requerimientos del cultivo de la estevia, los cuales son de 1400 a 1800 mm; bien distribuidos en el ciclo del cultivo según Pinaya (1996) y Pajas (2000).

**Anexo 20.** Huerto semillero de estevia ubicada en la colonia Santa Fe de Caranavi



**Anexo 21.** Arbusto de estevia en plena diseminación de semilla



**Anexo. 22** Preparación del sustrato



**Anexo 23.** Inicio del proceso de germinación



**Anexo 24.** Plántulas con 6 pares de hojas listas para el trasplante en el lugar definitivo



**Anexo 25.** Plantas establecidas en el lugar definitivo

