

## EFEECTO DE TRATAMIENTOS PREGERMINATIVOS EN SEMILLAS DE GRANADO

### [EFFECT OF PRE-GERMINATION TREATMENTS ON POMEGRANATE SEED]

Laura Elena Campos-Hermosillo<sup>1</sup>, Mayra Itzcalotzin Montero-Cortés<sup>1</sup>, Joaquín Alejandro Qui-Zapata<sup>2</sup>, José Juvencio Castañeda-Nava<sup>2</sup>, Antonia Gutiérrez-Mora<sup>2§</sup>

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Km. 10 Carr. Tlajomulco-San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México, C.P. 45640. <sup>2</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Unidad de Biotecnología Vegetal. Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México. C.P. 45019.

§Autor para correspondencia: (agutierrez@ciatej.mx).

### RESUMEN

La granada es una planta cuyo fruto tiene una alta demanda alimenticia por su alto contenido en antioxidantes, sin embargo, la propagación y disponibilidad de plantas presentan diversas dificultades entre las que se encuentran daños por enfermedades y plagas que restringen el desarrollo de la industria de la granada; en la actualidad se han enfocado diversos estudios para generar nuevos cultivares basado en el fitomejoramiento y en el que es fundamental optimizar la germinación de la semilla. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de tratamientos pre-germinativos: hidratación de la semilla (remojo 0, 24, 48 y 72 h), escarificación química (inmersión en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 70 y 98% por 20 y 40 min) y la escarificación por temperatura (almacenamiento de la semilla a 4 y 25 °C durante 30 días). Se calculó el porcentaje de germinación y la velocidad de germinación de las semillas por un periodo de 30 días. En el remojo de la semilla a las 24 y 48 h presentaron una germinación de 16 y 25%, respectivamente; en la escarificación por temperatura los tratamientos a 25 °C presentaron un 8% de germinación tanto en papel filtro como en tierra. Los mejores porcentajes de germinación (87.3%) se presentaron en la escarificación química (70 y 98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) con los mayores valores de velocidad de germinación (0.6376-0.7591 plantas/día). Se concluye que el tratamiento de escarificación químico es el más recomendable para obtener el mayor porcentaje de germinación en menor tiempo.

**Palabras clave:** *Punica granatum*, ácido sulfúrico, escarificación, temperatura, velocidad de germinación.

### ABSTRACT

The pomegranate is a plant that produces a fruit with a high nutritional demand due to its high content of antioxidants, however, the propagation and availability of plants present various difficulties, including damage by diseases and pests, which restrict the development of the pomegranate industry, today several studies have focused on generating new cultivars based on plant breeding and in which it is essential to optimize seed germination, so the aim of this research was to determine the effect of pre-germination treatments such as the hydration of the seed (soaking for 0, 24, 48 and 72 h), chemical scarification (immersion in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 70% and 98% for 20 and 40 min) and the scarification by temperature (storage of the seed at 4 and 25° C for 30 days), the germination percentage and the germination speed of the seeds were calculated up to 30 days. In the soaking of the seed at 24 and 48 h they showed germination of 16 and 25%, respectively; in the scarification by temperature the treatments at 25 °C showed 8% germination both on filter paper and in soil. The best germination percentages (87.3%) occurred in chemical scarification (70 and 98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) with the highest germination speed values (0.6376-0.7591 plant/day). Therefore, in this work it is concluded that the chemical scarification treatment is the most recommended to obtain the highest percentage of germination in the shortest time.

**Index words:** *Punica granatum*, sulfuric acid, scarification, germination speed, temperature.

## INTRODUCCIÓN

El granado es una planta perenne en condiciones tropicales, mientras que en condiciones subtropicales se comporta como una planta caducifolia (Aksoy and Dalkilic, 2019). Entre los principales países productores y exportadores del mundo se encuentran China, India e Israel, mientras que en Europa el principal productor de granada es España, en África, Egipto y en América de Sur destacan Perú y Chile (Espinoza *et al.*, 2017). En México la producción de granado se destacan los principales productores como; Morelos, Oaxaca, Hidalgo, Guanajuato y Jalisco, aportando en 70% de producción nacional (SIAP, 2019). En la actualidad, este fruto ha cobrado importancia mundial por sus propiedades antioxidantes, mismas que le confieren propiedades farmacológicas anticancerígenas, antitumorales, antimicrobianas, antidiarreicas, hepatoprotectivas y para el control de enfermedades renales (Assadi *et al.*, 2019; Lavoro *et al.*, 2021).

Por lo anterior, la demanda por la fruta de granada en el mercado va en aumento, sin embargo, los árboles de granada y las frutas son susceptibles a enfermedades virales, bacterianas y fúngicas durante su crecimiento (Caglayan *et al.*, 2019; Nouri *et al.*, 2020; Caglayan *et al.*, 2020). Recientemente se ha detectado una enfermedad vegetal emergente, referida como muerte regresiva por *Fusarium* o *Fusarium* dieback (FD), la cual se ha detectado en varias plantas en California y Florida. FD es causado por los efectos combinados de un escarabajo (*Scolytinae*) con un complejo ambrosial *Euwallacea fornicatus* y su compañero fúngico simbiótico *Fusarium euwallaceae*. Los escarabajos hembras crean galerías de cría en el tronco, que son simultáneamente inoculado con *Fusarium* sp. El hongo invade el tejido vascular del árbol, causando la muerte del árbol (Chen *et al.*, 2020).

Diferentes estudios demuestran que el complejo ambrosial, afectan a numerosas familias de árboles, así como especies de cultivos, maderera y ornamentales. La globalización y los modernos medios de transporte, han eliminado las barreras naturales que aislaban los complejos ambrosiales, facilitando la introducción de los mismos en nuevas áreas e incrementando el riesgo latente de una nueva asociación del hongo (*F. euwallaceae*) con un escarabajo nativo que afecte diversas especies de árboles incrementando el riesgo de infestación (Joseph and Keyhani, 2021; Short *et al.*, 2017), causando grandes pérdidas de plantas susceptibles al complejo ambrosial como los árboles de granado (*Punica granatum*). Por lo anterior es indispensable generar estrategias que estimulen mecanismos de defensa en plantas de granado para lograr resistir a la enfermedad (Tripathi *et al.*, 2019).

Para lograr lo anterior es imprescindible contar con un gran número de plantas, que permitan evaluar diversas estrategias efectivas para estimular la defensa de la planta. Por lo que esta investigación está enfocada a mejorar la germinación de semillas de granado, para obtener el mayor número de plantas requeridas para estudios futuros de planta-patógeno. En general la propagación de granado puede ser de forma vegetativa (estacas, acodos o por cultivo *in vitro*) o por semilla. Las plantas generadas a partir de semilla presentan un bajo porcentaje de germinación por el estado de dormancia, incapacidad de una semilla intacta y viable de germinar bajo condiciones de temperatura, humedad y concentración de gases que serían adecuadas para la germinación (Da Silva *et al.*, 2017).

La dormancia presenta cinco clases: 1. Fisiológica (PD). 2. Morfológica (MD). 3. La morfofisiológica (MPD). 4. Física (PY). 5. Combinada, fisiológica y física (PY+PD) (Baskin y Baskin, 2014). En el caso de la semilla de granada se presenta la dormancia fisiológica, en el que el endocarpo puede constituir una barrera mecánica para la germinación. Debido a esta condición los tratamientos pre-germinativos son de gran relevancia para optimizar la germinación de semillas si estas presentan algún tipo de dormancia.

Los tratamientos pregerminativos, son todos aquellos procedimientos necesarios para romper la dormancia de las semillas, esto es, el estado en que se encuentran algunas semillas tal que, estando vivas,

no son capaces de germinar sino hasta que las condiciones del medio sean las adecuadas para ello (Arnold, 1996). Los métodos pregerminativos más comunes para escarificación son: 1. Mecánica. 2. Química. 3. Por temperatura. 4. Húmeda (Merino-Valdes M. *et al.*, 2018). Por lo que el objetivo de este estudio es evaluar diferentes tratamientos pre-germinativos que permitan acelerar y promover la germinación de las semillas de granado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección y manipulación de semilla

Los frutos recolectados en el mes de noviembre-diciembre de 2020, los frutos se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Tlajomulco; se extrajeron las semillas, se eliminó el arilo y se sometieron en una solución de 2.0% de jabón con 10% de cloro comercial durante 5 min, se enjuagaron con suficiente agua de la llave hasta eliminar el exceso de jabón y cloro. Posteriormente se colocaron las semillas sobre papel y se dejaron secar en condiciones de oscuridad a una temperatura de 25 °C durante 5 días (d).

### Efecto del tiempo de la escarificación húmeda (hidratación de semilla de granado) en la germinación

Después del proceso de desinfección y desecación de las semillas de granado, estas fueron almacenadas durante 30 días en condiciones de oscuridad a una temperatura de 4 °C, posteriormente se lavaron las semillas en una solución de jabón al 2% con 5 gotas de Tween durante 10 min, en condiciones asépticas se sometieron en una solución de 1.0 g l<sup>-1</sup> de benomilo con 0.3 g l<sup>-1</sup> de estreptomina durante 20 min, después se colocaron en cloro al 30% con 5 gotas de Tween durante 30 min; finalmente se colocaron en 70 °C de alcohol durante 1 min. Cabe mencionar que después de cada tratamiento se realizaron dos lavados de agua destilada estéril durante 1 min, posteriormente se evaluó el efecto de la hidratación de semillas como se indica a continuación: TR1. Control (sin remojo); TR2. 24 h de remojo; TR3. 48 h de remojo y TR4. 72 h de remojo. Posteriormente las semillas se colocaron en un frasco con papel filtro a 25 °C en condiciones de fotoperiodo (12h luz) y la germinación de la semilla se evaluó a los 30 días.

### Efecto de temperatura y sustrato en la germinación de semillas de granado

Después del proceso de desinfección y desecación de las semillas, se evaluó el efecto del sustrato (papel filtro, tierra) y la temperatura en el almacenamiento de la semilla durante 30 días (4 y 25 °C), evaluando los siguientes tratamientos: TT1. 25 °C en papel filtro; TT2. 25 °C en tierra; TT3. 4 °C en papel filtro; TT4. 4 °C en tierra. Posteriormente las semillas se germinaron a una temperatura de 25 °C en condiciones de fotoperiodo (12 h luz) y la germinación de la semilla se evaluó a los 30 días.

### Efecto del ácido sulfúrico en la germinación de semillas de granado

Después del proceso de desinfección y desecación de las semillas de granado, estas fueron almacenadas durante 30 días en condiciones de oscuridad a una temperatura de 4 °C, posteriormente se evaluó el efecto del ácido sulfúrico a diferentes concentraciones y diferentes tiempos de exposición en la semilla en papel filtro con los siguientes tratamientos: TA1. Control; TA2. 20 min a 70% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; TA3. 40 min a 70% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; TA4. 20 min a 98% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; TA5. 40 min a 98% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posteriormente las semillas se germinaron a 25 °C en fotoperiodo (12 h luz) y la germinación de la semilla se evaluó a los 30 días.

## Índice de velocidad de germinación (IVG)

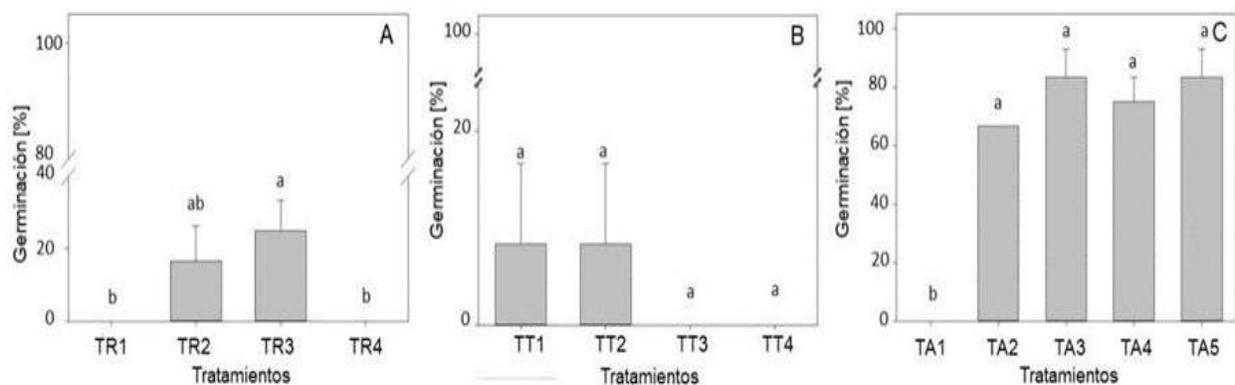
Se realizaron conteos cada tercer día del número de semillas germinadas. Como criterio de germinación se consideró la protrusión radicular. El cálculo del IVG se realizó de acuerdo con la propuesta de Maguire (1962).

## Análisis estadístico

Los datos presentados corresponden a la media de cuatro réplicas, cada una con cinco semillas, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA); posteriormente se realizó la comparación de medias por la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ) empleando el software MINITAB 17.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de acelerar e incrementar la germinación de semillas de granado (*P. granatum*), en este estudio se emplearon diferentes tratamientos pre-germinativos para buscar romper la dormancia física que presentan las semillas de granado, dentro de estos tratamientos se evaluaron diferentes tiempos de imbibición en agua, en este tratamiento las semillas se remojaron en agua durante diferentes tiempos (Figura 1).



**Figura 1.** Germinación de semillas de granada escarificadas. A. Semillas hidratadas, germinadas en papel filtro TR1 (0 h), TR2 (24 h), TR3 (48 h) y TR4 (72 h). B. Escarificación de semillas por frío, germinadas en papel filtro y tierra, TT1 (25°C por 30 días en papel filtro), TT2 (25°C por 30 días en tierra), TT3 (4°C durante 30 días en papel filtro) y TT4 (4 °C durante 30 días en tierra). C) Escarificación de semillas por ácido sulfúrico, germinadas en papel filtro, TA1 (control), TA2 (70% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 20 min), TA3 (70% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 40 min), TA4. (98% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 20 min) y TA5 (98% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 40 min). La barra gris representa la media con el error estándar y las diferentes letras en cada gráfica denota diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

En estos tratamientos (TR1, TR2, TR3, TR4), TR2 y TR3 que corresponden a un remojo de 24 y 48 h, los cuales presentaron 16.67 y 25% de germinación de semillas, respectivamente; a los 30 días, ambos tratamientos fueron la mejor respuesta de los tratamientos de remojo, presentando diferencia significativa comparado con los tratamientos TR1 (control) y TR4. En tanto que para los tratamientos TR1 y TR4 (0 y 72 h de remojo respectivamente) no se obtuvo germinación. Es conocido que el proceso de germinación en semillas de granada es bajo debido a la dormancia física, causada por la dureza del endocarpo de la semilla constituyendo una barrera mecánica para la germinación (TR1). Las semillas remojadas en agua pueden remover inhibidores químicos que puede presentar la cubierta, así como ablandar el endocarpo promoviendo la germinación de acuerdo con Hartmann (1988); como se observó en los tratamientos TR2 y TR3. Sin

embargo, en exceso de rehidratación de las semillas actuaría desfavorablemente para la germinación, pues dificultaría la llegada de oxígeno al embrión, fase I, del proceso de germinación (Ramón y Mendoza, 2002), como es el caso del tratamiento T4 en el que la semilla permaneció 72 h sumergida en agua (remojo).

Durante la germinación, las semillas embebidas en agua presentan tres fases de la actividad respiratoria, en la primera fase la semilla absorbe agua rápidamente iniciando la respiración, se lleva a cabo la reparación del material genético y de las mitocondrias e inicia síntesis de proteínas a partir de mensajeros preformados. Durante la fase II, se lleva a cabo la síntesis de proteínas a partir de mensajeros que se sintetizan en la misma fase, al final la semilla completa el proceso de germinación y de emergencia (Bewley y Black, 1994). Comparado con otras semillas, la hidratación de semillas en otras especies reporta porcentajes de germinación del 7% para variedades de semilla con endocarpo duro y hasta el 98% para variedades con endocarpo blando (Chandra y Babu, 2010).

En la escarificación por temperatura tanto en papel filtro como en tierra se obtuvo mejor germinación a 25 °C (8.3% de germinación); mientras que a 4 °C no se presentó germinación de la semilla hasta los 30 días de evaluación, aunque estadísticamente no se tienen diferencia significativa entre los tratamientos, TT1-TT4 (Figura 1).

Por otro lado, la escarificación por frío combinado con la escarificación húmeda (remojo de semilla a las 24 y 48 h), así como la escarificación química con ácido sulfúrico, como se mencionará más adelante tienen un efecto positivo en la germinación de semillas de granado. Los resultados de esta investigación no coinciden con lo reportado por Rawat *et al.* (2010), en el que al aplicar únicamente la escarificación por temperatura (4 °C durante 30 días), presentó 91.66% de germinación a los 21 días de evaluación, atribuyendo este efecto a la reducción de los inhibidores de la germinación (Frankland and Wareing, 1962; Bello *et al.*, 1998).

En lo que respecta a los tratamientos por escarificación química con ácido sulfúrico, se evaluaron diferentes concentraciones y periodos de exposición al agente químico, en todos los tratamientos con ácido sulfúrico se presentaron porcentajes de germinación iguales o mayores al 67%, el pretratamiento de 70 y 98% de ácido sulfúrico en semillas de granado durante 20 min presentaron 67 y 75% de germinación de semillas, respectivamente; a mayor tiempo de exposición del ácido sulfúrico en las semillas de granado (40 min) promovió la germinación en un 83% para ambas concentraciones del químico. Los tratamientos de escarificación (ya sea química o mecánica) buscan disminuir el efecto de la dormancia física, la cual ocurre como un proceso de protección de la semilla al presentar una capa impermeable o una testa muy dura. Dicha capa obstaculiza e impone una resistencia mecánica a la emergencia de la plántula y debe ser debilitada para que la humedad entre en contacto con el embrión y así permitir el proceso de germinación. Con la escarificación química se promueve una germinación rápida y uniforme al eliminar la testa permitiendo el adecuado proceso de embeber a la semilla (Vázquez *et al.*, 2019).

En cuanto a la velocidad de germinación los tratamientos con diferente tiempo de remojo (hidratación de semilla), aunque no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, el TR3 (48 horas de remojo) mostró tener la mejor velocidad de germinación (0.1046 plantas germinadas/día), seguido del tratamiento TR2 (24 h de remojo) con un valor de 0.0465 plantas germinadas/día. Al igual que los tratamientos con remojo, los tratamientos de escarificación por temperatura tampoco presentaron diferencia significativa en la velocidad de germinación entre tratamientos (a temperaturas de 25 y 4 °C, ambos en diferentes soportes-tierra y papel filtro); sin embargo, se obtuvo una mayor velocidad de germinación (0.0083 plantas germinadas/día) a temperatura de 25 °C tanto en papel filtro como en tierra (TT1 y TT2) comparada con los tratamientos en los que se almacenaron las semillas a temperatura de 4 °C es estos mismos sustratos (TT3 y TT4).

Para los tratamientos de escarificación con ácidos sulfúrico en diferentes tiempos de exposición, los tratamientos con mayor concentración de ácido (98%) mostraron la mejor velocidad de germinación (0.7984 y 0.7591 plantas germinadas/día) tanto a 20 como a 40 min. Mientras que los tratamientos con menor concentración de ácido sulfúrico (70%) presentaron una velocidad de germinación menor (entre 0.6376 y 0.2880 plantas germinadas/día). En el cuadro 1 se muestran los resultados de la velocidad de crecimiento en todos los tratamientos.

**Cuadro 1.** Velocidad de germinación de semillas de granada.

Semillas hidratadas (remojo)		Semillas a diferentes temperaturas		Semillas tratadas con ácido	
Tratamiento	VG (plantas/día)	Tratamiento	VG (plantas/día)	Tratamiento	VG (plantas/día)
TR1	0.0000±0.000a	TT1	0.0083±0.008a	TA1	0.0000±0.000b
TR2	0.0465±0.074a	TT2	0.0083±0.008a	TA2	0.2880±0.079ab
TR3	0.1046±0.081a	TT3	0.0000±0.000a	TA3	0.6376±0.222a
TR4	0.0000±0.000a	TT4	0.0000±0.000a	TA4	0.7984±0.116a
				TA5	0.7591±0.164a

TR. Semillas hidratadas, germinadas en papel filtro TR1 (0 h), TR2 (24 h), TR3 (48 h) y TR4 (72 h). TT. Escarificación de semillas por frío, germinadas en papel filtro y tierra, TT1 (25 °C por 30 días en papel filtro), TT2 (25 °C por 30 días en tierra), TT3 (4 °C durante 30 días en papel filtro) y TT4 (4 °C durante 30 días en tierra). TA. Escarificación de semillas por ácido sulfúrico, germinadas en papel filtro, TA1 (control), TA2 (70% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 20 min), TA3 (70% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 40 min), TA4. (98% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 20 min) y TA5 (98% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 40 min). Se representa la media con el error estándar y las diferentes letras entre columnas denotan diferencias significativas (Tukey, p<0.05).

## CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos se puede afirmar que los pretratamientos de remojo y escarificación con ácido sulfúrico (98%), incrementaron los porcentajes de germinación de las semillas de granado comparado con el control. En esta investigación, se observó que el tratamiento más viable para la germinación de las semillas de granado es someterlas a un proceso químico con ácido sulfúrico; en cuanto a los tratamientos de ácido evaluados para la germinación no hay diferencia significativa entre utilizar 70 o 98% de ácido sulfúrico; sin embargo, se presenta una mayor velocidad de germinación de las semillas que se sometieron a una mayor concentración de ácido sulfúrico.

## AGRADECIMIENTO

Al Instituto Tecnológico de Tlajomulco (ITTJ), al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología del Estado de Jalisco (CIATEJ) y al proyecto FORDECYT 292399 financiado por CONACYT, así como al Laboratorio Nacional PlanTECC por el apoyo económico otorgado en el proyecto Mantenimiento de la infraestructura del Laboratorio Nacional PlanTECC, número: 315918.

## LITERATURA CITADA

- Assadi, I., W. Elfalleh, M.A. Benabderrahim, H. Hannachi, W. Chaalen and A. Ferchichi. 2019. Nutritional quality and antioxidant capacity of a combination of pomegranate and date juices. *Int. J. Fruit Sci.* 19(3):300–314. doi: <https://doi.org/10.1080/15538362.2018.1512438>.
- Aksoy, D. and Z. Dalkilic. 2019. Determination of blooming, pollen and fruit set characteristics in *Punica granatum*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(4): 1258-1263. <https://doi.org/10.15835/nbha47411216>.

- Arnold, F.E. 1996. Manual de vivero forestal: Elaborado para algunas especies forestales nativas de la zona templada del Sur de Chile. Documento Técnico CONAF-DED. 24 p.
- Baskin, J.M. and C.C. Baskin. 2014. What kind of seed dormancy might palms have? *Seed Science Research* 24(1):17-22. <https://doi.org/10.1017/S0960258513000342>.
- Bello, I.A., H. Hatterman-Valentini and M.D.K. Owen. 1998. Effects of stratification, temperature, and oxygen on woolly cupgrass (*Eriochloa villosa*) seed dormancy. *Weed Science* 46(5): 526-529. <https://doi.org/10.1017/S0043174500091037>.
- Bewley, J.D. and M. Black. 1994. *Seeds physiology of development and germination*. 2nd (Ed.). Plenum Press, New York. 445 p.
- Çaglayan K, M. Gazel, M. Acioglu, H.D. Kocabag and H.M. Sipahioglu. 2019 Molecular identification of phytoplasmas in ornamental pomegranates in Tukey. *Phytopathogenic Mollicutes* 9(1):3-4. 10.5958/2249-4677.2019.00002.1.
- Chen, Y, T.W. Coleman, A.L. Poloni, L. Nelson and S.J. Seybold. 2020. Reproduction and Control of the invasive polyphagous shot hole borer (*Euwallacea nr. fornicates*) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), in three species of hardwoods: Effective Sanitation Through Felling and Chipping. *Environ Entomol.* 49(5):1155-1163. doi: 10.1093/ee/nvaa103. PMID: 32885817.
- Chandra, R. and D.K. Babu. 2010. Propagation of pomegranate: a review. *Pomegranate. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 4(2): 51-55.
- Da Silva, J.G., K. Pinheiro-Lope, J. Araújo Cavalcante, N.A. Evangelista-Pereira and R.C. Almeida-Barbosa. 2017. Pre-germinative treatments in pomegranate seeds (*Punica granatum* L.): Effect on physiological quality. *Rev. Bras. Frutic.*, 39(Spe):1-5. <https://doi.org/10.1590/0100-29452017732>.
- Espinoza, P.J.R., P.D. Díaz, B.P.L. Ordoñez, F.P F. Mancillas and R.Y. Palma. 2017. Granado (*Punica granatum* L.) La nueva alternativa en la reconversión sustentable de cultivos en Chihuahua. (Consulta: 13 de septiembre de 2019).
- Frankland, B. and P.F. Wareing., 1962. Changes in endogenous gibberellins in relation to chilling of dormant seeds. *Nature* 194 : 313-314. <https://doi.org/10.1038/194313a0>.
- Hartmann, H.D. y D. Kester. 1988. *Propagación de plantas*. México D.F. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. 760 p.
- Joseph, R. and N.O. Keyhani. 2021. Fungal mutualisms and pathosystems: life and death in the ambrosia beetle mycangia. *Appl Microbiol Biotechnol.* 105(9):3393-3410. doi: 10.1007/s00253-021-11268-0. Epub 2021 Apr 10. PMID: 33837831.
- Lavoro, A., L. Falzone, G. Gattuso, R. Salemi, G. Cultrera, G.M. Leone, G. Scandurra, S. Candido and M. Libra. 2021. Pomegranate: A promising avenue against the most common chronic diseases and their associated risk factors (Review). *International Journal of Functional Nutrition* 2(6). <https://doi.org/10.3892/ijfn.2021.16>.
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergences and vigor. *Crop Science* 2:176-177. <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>.
- Merino-Valdés, M, P. Andrés-Meza, O.R. Leyva-Ovallo, H. López-Sánchez, J. Murguía-González, R. Núñez-Pastrana, M. Cebada-Merino, R. Serna-Lagunes, A. Espinosa-Calderón, M. Tadeo-Robledo, M. Sierra-Macías y J.L. Rosario-Arellano. 2018. Influencia de tratamientos pregerminativos en semillas de chile manzano (*Capsicum pubescens* Ruiz and Pav.). *Acta Agron.* 67(4): 531-538.
- Nouri, B, S.S. Mohtasebi and S. Rafiee. 2020. Quality detection of pomegranate fruit infected with fungal disease. *Int J Food Prop* 23(1):9–21. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1705851>
- Ramón, M. y C. Mendoza. 2002. Efecto del deterioro post-corte sobre la germinación de la semilla asexual de cinco variedades de caña de azúcar. *Revista Facultad de Agronomía* 19(4): 264-272.
- Rawat, J.M.S., Y.K. Tomar and V. Rawat. 2010. Effect of stratification on seed germination and seedling performance of wild pomegranate. *Journal American Science* 6(5): 97–99.
- Short, D.P.G., K. O'Donnell, J.E. Stajich, J. Huler, T. Kijimoto, M.C. Berger, A.M. Macias, E.J. Spahr, C.C. Bateman, A. Eskalen, S.C. Lynch, A.I. Cognato, M.F. Cooperband and M.T. Kasson. 2017. PVR mutiplexes discriminate *Fusarium* symbionts of invasive *Euwallacea* ambrosia beetles that inflict

damage in numerous tree species throughout the United States. *Plant Disease* 101(1): 233-240. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-1046-RE>.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2019. Servicio de información estadística agroalimentaria y pesquera. <https://blogagricultura.com/estados-productores-granada-2019/>.

Tripathi D., G. Raikhy and D. Kumar. 2019. Chemical elicitors of systemic acquired resistance-Salicylic acid and its functional analogs. *Current Plant Biology* 17: 48-59.

Vázquez, W., P. Pupiales, P. Viteri, A. Sotomayor, C. Feican, D. Campaña and W. Viera. 2019. Escarificación química y aplicación de ácido giberélico para la germinación de semillas de cultivares de mora (*Rubus glaucus* Benth). *Interciencia* 44(3): 161-166.