

# ESTUDIO DE PARÁMETROS ADECUADOS PARA LA CONSERVACIÓN Y ESTIMULACIÓN DE LA GERMINACIÓN EN SEMILLAS DE FRIJOL COMÚN (*PHASEOLUS VULGARIS* L.).

Nélida A. Fraga Aguiar, Alfredo Socorro, Susana Calderón, Nivia Cantero, Jorge Félix de la Cruz, María del C. Alonso y María Figueroa.

*Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), Cuba.*

*e-mail: nelida@inifat.co.cu*

## RESUMEN.

El establecimiento de colecciones *ex situ* requiere de investigaciones dirigidas a optimizar las condiciones de conservación para las semillas de las diferentes especies, ya que estas dentro de la cámara de almacenamiento, inevitablemente disminuyen su viabilidad. Se presentan los resultados obtenidos en cuanto a la determinación de parámetros adecuados para la conservación y estimulación de la germinación de semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Se utilizaron semillas de tres variedades representativas de la colección, las que fueron almacenadas en 2 tipos de envases, con 2 contenidos diferentes de humedad. Se estableció una escala de valores para el vigor a través del índice de velocidad de emergencia (IVE), lo que nos permitió determinar el valor de humedad crítica. Se evaluó la capacidad de la técnica del tratamiento magnético en esta especie. Los resultados obtenidos corroboran que existe un comportamiento diferencial de las variedades dentro de la especie. Las semillas de las variedades de frijol negro y rojo se mantienen sin diferencias estadísticamente significativas durante el primer año de almacenadas, independientemente del tipo de envase utilizado y de la humedad interna de las semillas. El frijol blanco se conservó mejor al envasar las semillas en sobres de aluminio a humedades de 6.7%, aunque en sentido general la disminución de la germinación de la semilla dependió en mayor medida del tiempo de conservación que de las humedades a las que fueron conservadas. Los parámetros del régimen de exposición, ajustados para provocar una significativa recuperación de la viabilidad fueron: 225 mT-120 seg.

Palabras claves: Conservación *ex situ*, magnetismo, semillas.

## ABSTRACT.

### STUDY OF APPROPRIATE PARAMETERS FOR CONSERVATION AND STIMULATION OF BEAN (*PHASEOULUS VULGARIS* L.) SEED GERMINATION.

The results for the determination of appropriate parameters in the conservation and stimulation of bean (*Phaseoulus vulgaris* L.) seed germination are shown in this paper. Three representative varieties from the genebank collection were used, which were stored at two kind of container for two different seed moisture contents. A scale for the vigor was established through the emergency speed coefficient (IVE). This parameters allowed us the determination of critical moisture. The magnetic seed treatment capacity was also evaluated to germination recovery. The results demonstrated that there are differential behavior between different varieties in the same specie. Seed varieties of black and red bean were preserved without differences during the first storing years, independently the kind of container and seed moisture content. Aluminum cover and 6.7% of moisture content, was the higher conservation for the white bean, although the storing period influenced on the germination decreasing more than seed moisture. The exposure parameters in magnetic field treatment at 225 mT during 120 seconds caused a seed viability recovery.

Key words: Ex *situ* conservation, magnetic, seeds.

## INTRODUCCIÓN.

La conservación de semillas constituye una de las tareas más importantes de los bancos de germoplasma, ya que de esta manera se preserva la diversidad biológica de las plantas manteniendo la viabilidad y la integridad de las accesiones (Wu *et al.*, 1998). Sin embargo, factores tales como la constitución genética de las semillas, la temperatura a la cual ellas se mantienen, su humedad y la duración del período de almacenamiento, determinan la viabilidad de las mismas bajo conservación (Alexander y Doijode, 1995).

La respuesta a las diferentes condiciones de almacenamiento de las semillas varía en dependencia también de la especie de que se trate e incluso de la variedad dentro de cada especie (Hong y Ellis, 1995; Asiedu *et al.*, 2000; García y Lima, 2000; Rajgopal y Chandran, 2000; Zheng *et al.*, 2001). Se ha demostrado que las condiciones dentro de los envases utilizados repercuten más en la longevidad de las semillas almacenadas, que las condiciones del ambiente en la cámara climatizada (Gómez-Campo, 2002, 2006) y dentro de ellas, la humedad es uno de los que posee mayor incidencia (Clerkx *et al.*, 2003).

El objetivo del presente trabajo fue determinar los niveles críticos de humedad del frijol, conocer la respuesta a la conservación *ex situ* de diferentes variedades, así como evaluar el efecto de la técnica del tratamiento magnético sobre la germinación de semillas almacenadas, con vistas a ponderar su utilidad en la estimulación de la viabilidad de las mismas.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### Conservación de la viabilidad de semillas.

#### - Determinación de la humedad crítica de la especie.

Semillas de 3 variedades de frijol común fueron colocadas en una desecadora con sílica gel, la cual fue renovada y activada diariamente. El contenido de humedad fue medido gravimétricamente según ISTA (1999) y el peso seco fue determinado a 130°C±2 durante dos horas. Las humedades y porcentajes de germinación iniciales en las muestras de las distintas variedades se muestran en la tabla 1.

Tabla 1.- Contenidos de humedad y % de germinación iniciales de las diferentes especies y variedades estudiadas.

Variedades	Contenido de humedad	% germinación
Cuba C-25-9B (grano blanco)	13,36	92
CubaC-25-9N (grano negro)	13,63	95
Velazco Largo (grano rojo)	15,20	95

A los 10 y 15 días de montado el experimento se estudiaron los parámetros: porcentaje de germinación (PG), porcentaje de emergencia (PE) y el índice de velocidad de emergencia (IVE), calculado este último según la fórmula propuesta por Maguire (1962):

$$IVE = \sum_i \frac{np_i}{ND_i} 100$$

donde,  $np_i$  y  $ND_i$  son el número de plántulas y el número de días al conteo  $i$ -ésimo, respectivamente.

Fue correlacionado el índice de velocidad de emergencia (obtenido a los 10 y 15 días de iniciada la desecación) con el porcentaje de germinación, lo que nos permitió establecer la escala de vigor, tomando como límite superior el resultado obtenido cuando las 25 semillas germinaron al cuarto día (100%). Para medio vigor se consideraron las semillas germinadas al quinto día (17-18 aproximadamente) lo que representa un 70 % de germinación y el bajo vigor se obtuvo con 12 a 13 semillas para un 50% de germinación.

### **- Condiciones adecuadas de almacenamiento.**

Se colocó una muestra representativa de semillas de cada variedad en desecadoras con sílica gel activada, con el objetivo de disminuir los contenidos de humedad hasta dos valores diferentes (Tabla 2).

Tabla 2.- Contenidos de humedad de la semilla utilizados en las diferentes variedades en estudio.

<b>Variedades</b>	<b>Niveles de C.H (%)</b>
'Cuba C 25-9' (n)	4,4 (H1) y 6,6 (H2)
'Cuba C 25-9' (b)	4,7 (H1) y 6,9 (H2)
'Velazco largo'	4,9 (H1) y 6,5 (H2)

Se tomó una muestra de 400 semillas de cada humedad utilizada por variedad y se depositaron en dos tipos diferentes de envase: pomos de cristal (E1) y sobres de aluminio (E2), los cuales se conservaron en una cámara fría a una temperatura de  $5 \pm 2$  °C. Durante un período de 24 meses se extrajeron de la cámara las semillas de cada variante y se realizaron las pruebas de germinación al cumplirse el tiempo de conservación (C) planificado (C1: inicial, C2: 4 meses, C3: 8 meses, C4: 12 meses, C5: 16 meses, C6: 20 meses, C7: 24 meses).

Los porcentajes de germinación obtenidos se transformaron con  $\arcsen \sqrt{x}$  y se les efectuó análisis de varianza de clasificación triple y la prueba de Tukey, a un nivel de significación del 5%, para la comparación de medias.

### **Estimulación de la viabilidad utilizando métodos físicos.**

Los experimentos se realizaron bajo condiciones de laboratorio utilizando un magnetizador formado por electroimanes acoplados a un circuito magnético con un espesor de aire cuya inducción magnética es "B" y donde las semillas fueron colocadas durante un tiempo de exposición " $t_E$ ". Se utilizaron semillas de baja viabilidad de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. CC 25-9 N, para analizar la respuesta germinativa respecto a un intervalo amplio de dosis con valores de " $t_E$ " de 1 y 2 minutos y de "B" de 75, 100, 125, 150, 175, 200 y 225 mT.

Las siembras se realizaron en placas petri con 50 semillas cada una y 4 réplicas, así como la aplicación de la prueba "t de student" para evaluar las diferencias tomando como criterio de significación  $p < 0.05$ . Los valores medios fueron presentados con sus respectivas desviaciones medias (Lerch, 1977).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **Conservación de la viabilidad de semillas de frijol común.**

#### **- Definición de las humedad crítica de la especie.**

A los 10 días de iniciada la desecación de las semillas en sílica gel los cultivares habían reducido su humedad a valores entre 3,3 y 3,5%. Al final del experimento (15 días) alcanzaron un contenido de humedad entre 2,8 y 2,9%. Los resultados aquí obtenidos permitieron valorar el comportamiento del vigor de las semillas asociados a la humedad de estas y se propone la siguiente escala de vigor:

Alto vigor: >4

Medio vigor: 3

Bajo vigor: <3

En la tabla 3 se muestran los valores de humedad producto de la desecación en silica gel. Se puede observar que a los 10 días de iniciada la desecación, los porcentajes de germinación se mantienen altos. Se muestran las variables evaluadas a los 15 días y puede observarse que esta constituye la humedad crítica de la especie en estudio, ya que como se aprecia, los % de germinación y de emergencia se corresponden con plántulas de bajo vigor y se obtienen índices significativos al correlacionar los % de germinación con el IVE.

Tabla 3.- Comportamiento de las variables evaluadas a los 10 y 15 días de iniciada la desecación. d: días.

VARIABLES EVALUADAS		CULTIVARES		
		CC-25-9B	CC-25-9N	Velazco Largo
% Humedad	10 d.	3,3	3,4	3,4
	15 d.	2,6	2,7	2,8
PG	10 d.	88	92	95
	15 d.	37	40	45
PE	10 d.	88	96	95
	15 d.	67	70	72
IVE	10 d.	4,4	4,0	4,0
	15 d.	1,85	2,00	1,80
Índice de correlación	10 d.	0.9179*	0,9779*	0,9840*
	15 d.	0.8341*	0.8669*	0.8781*

#### - Condiciones adecuadas de almacenamiento.

Los análisis de varianza realizados para los cultivares de color negro ('Cuba C-25-9') y rojo ('Velazco largo'), muestran diferencias significativas sólo para el factor tiempo de conservación, mientras que al analizar la variedad de grano blanco 'Cuba C 25-9', se encontró que existen diferencias para los tres factores en estudio: contenido de humedad, envases y tiempo de conservación, así como para las interacciones entre envases y contenidos de humedad, y de este último con los tiempos de conservación.

Al analizar la variación de los niveles de germinación con el tiempo de conservadas las semillas de las variedades de frijol negro y rojo pudo observarse que estos se mantienen sin diferencias estadísticamente significativas durante el primer año de almacenadas, independientemente del tipo de envase utilizado y de la humedad interna de las semillas. Posteriormente se produce una disminución del potencial germinativo inicial de las mismas que llega a ser superior al 25% para la variedad de grano negro y de 20% para la de grano rojo, a los 2 años de conservación (Tabla 4).

Los resultados de la Prueba de Tukey para la interacción envase x humedad en la variedad de frijol blanco 'Cuba C 25-9' (Fig.1) muestran que los mayores valores de germinación se obtienen al envasar las semillas en sobres de aluminio (E2) a humedades de la semilla del 6.7% (H2), superior a las otras tres combinaciones, entre las que no existen diferencias. Estos resultados coinciden con los obtenidos por la FAO y el IPGRI (1994), donde se recomienda que las semillas deben tener un contenido de humedad entre  $5 \pm 2$  % antes de su almacenamiento, aunque otros autores como Ellis *et al.*, (1988, 1989,1990, 1995, 1996) y Vertucci y Roos (1990), en trabajos desarrollados con diferentes especies demostraron que la longevidad de las semillas se puede prolongar, disminuyendo el contenido de humedad de éstas a valores inferiores a los recomendados. Así mismo se puede apreciar una disminución de la germinación de la semilla dependiente en mayor medida del tiempo de conservación que de las humedades a que fueron estas conservadas (Fig.2).

Tabla 4.- Resultados de la prueba de Tukey para el factor tiempo de conservación. Variedades 'Cuba C 25-9' (negro) y 'Velazco largo' (rojo). Nivel de significación del 5 %. Medias T: Medias transformadas. Medias S/T: Medias sin transformar.

Tiempo de conservación	'Cuba C 25-9 (negro)'			'Velazco largo (rojo)'		
	Media T	Media S/T	Signif.	Media T	Media S/T	Signif.
Inicio (T <sub>1</sub> )	77.07	95.0	A	77.07	95.00	A
4 meses (T <sub>2</sub> )	73.78	92.2	A	73.21	91.69	AB
8 meses (T <sub>3</sub> )	69.14	87.3	AB	71.15	89.58	AB
12 meses (T <sub>4</sub> )	70.05	88.3	AB	68.79	86.90	ABC
16 meses (T <sub>5</sub> )	64.75	81.8	B	67.81	85.78	BC
20 meses (T <sub>6</sub> )	55.42	67.8	C	64.40	81.38	BC
24 meses (T <sub>7</sub> )	55.56	68.0	C	60.65	75.98	C

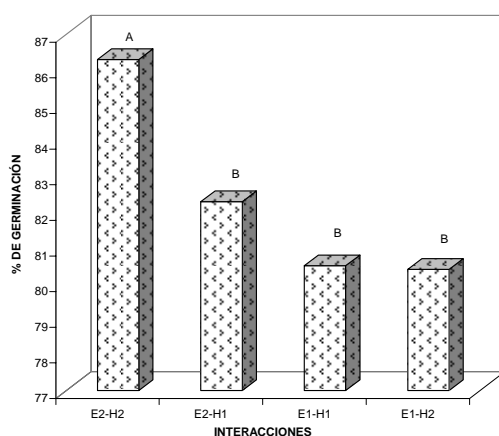


Fig. 1 Resultados de la Prueba de Tukey para la interacción Envase x Humedad en la variedad de frijol blanco 'Cuba C 25-9'.

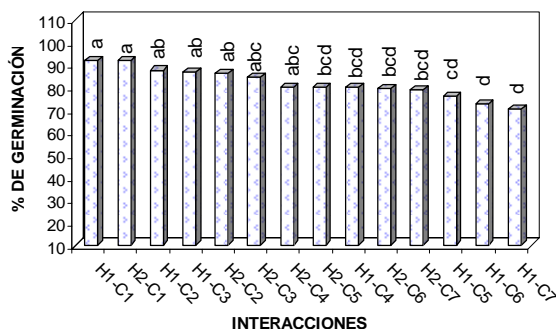


Fig 2.- Resultados de la Prueba de Tukey para la interacción Humedad x Tiempo de Conservación en la variedad de frijol blanco.

**Estimulación de la viabilidad utilizando métodos físicos.**

La tabla 5 muestra los resultados obtenidos en el cultivar de frijol 'Cuba C 25-9 N', sometido a una gama amplia de tratamientos. En general se observa una tendencia a mejorar el efecto a los dos minutos de exposición respecto a t<sub>E</sub>=1 minuto. Los máximos valores del efecto estimulante llegan hasta el 19.7% con B=225 mT. Se observa que existen parámetros del régimen de exposición (200 mT a 1 minuto) donde se observa una inhibición significativa de un 8% por debajo del control.

Tabla 5. Valores del porcentaje de germinación del frijol y la habichuela como porcentaje con respecto al control. (\*Diferencia significativa para  $\alpha < 0.05$ ).

B (mT)	0	75	100	125	150	175	200	225
1 min	100	100	105.7*	102.3	97.7	98.9	92*	102.3
2 min	100	111.8*	110.5	118.4*	111.8*	110.5*	115.8*	119.7*

El trabajo se realizó utilizando un magnetizador alimentado con corriente directa, lo que limita su uso solo para valores pequeños de  $t_E$  (1-2 minutos), ya que para períodos de tiempos mucho mayores (del orden de los días) la aplicación del equipo sería inadecuada. Estudios anteriores con imanes permanentes han podido corroborar una cierta correlación dosis-efecto en escalas de D mucho mayores ( $B=250$  mT y  $t_E=10$  días  $D \approx 2 \cdot 10^4$  MJ·s·m<sup>-3</sup>), pudiéndose establecer una ecuación que relaciona el efecto relativo al control, respecto a D (Socorro *et al.*, 2006).

### CONCLUSIONES

- Los estudios realizados corroboran que existe un comportamiento diferencial de las variedades dentro de la especie, en la conservación *ex situ* en cámaras frías.
- Las variedades de frijol negro y rojo mantienen niveles de germinación altos durante el primer año de almacenadas, independientemente del tipo de envase utilizado y de la humedad interna de las semillas. El frijol blanco se conservó mejor al envasar las semillas en sobres de aluminio a humedades de 6.7%, aunque en sentido general la disminución de la germinación de la semilla dependió en mayor medida del tiempo de conservación que de las humedades a que fueron éstas conservadas.
- En esta especie las semillas no deben ser desecadas para su almacenamiento por debajo de 3,0% de humedad, ya que este constituye el nivel crítico para la especie y se deteriora el vigor.
- Es posible aplicar la técnica de tratamiento magnético para la estimulación de la germinación de semillas. Los parámetros del régimen de exposición, ajustados para provocar una significativa recuperación de la viabilidad en semillas de frijol es de 225 mT durante 120 segundos.

### Referencias.

- Alexander MP and Doijode SD. 1995. Electromagnetic field, a novel tool to increase germination and seedling vigour of conserved onion (*Allium cepa*, L.) and rice (*Oryza sativa*, L.) seeds with low viability. Plant Genetic Resources Newsletter, 104: 1- 5.
- Asiedu, E. A.; Powell, A. A.; Stuchbury, T. (2000): Cowpea seed coat chemical analysis in relation to storage seed quality. *African Crop Science Journal* 8 (3): 283-294.
- Clerkx, E.J. M., Blankestijn-De Vries, H., Ruys, G.J., Groot, S.P.C., and Koornneef, M. (2003): Characterization of green seed, an Enhancer of *abi3-1* in
- Ellis, R. H ; T. D. Hong y E. H. Roberts (1988): A low- moisture content limit to logarithmic relation between seed moisture content and longevity. *Annals of Botany* 61,405-408.
- Ellis, R. H; T. D. Hong y E. H. Roberts(1989): A comparison of the low-moisture content limit to the logarithmic relation between seed moisture and longevity y twelve species . *Annals of Botany* 63, 601-611.
- Ellis, R. H; T. D. Hong y E. H. Roberts (1990): Low-moisture content limits to relation between seed longevity and moisture. *Annals of Botany* 65, 493-504.

- Ellis, R. H; T. D. Hong y E. H. Roberts (1995): Survival and vigour of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed stored at low and very low moisture contents. *Annals of Botany* 76:521-534
- Ellis, R. H; T. D. Hong., D. Astley., A. E. Pinnegard y H. L. Kraak (1996): Survival of dry and ultra- dry seed of carrot, groundnut, lettuce, oilseed rape and onion during five years; hermetics storage at two temperatures. *Seed Science and Technology* 24, 347-358.
- FAO/IPGRI (1994): Genebank Standards. Rome, Food and Agricultural Organization of the United Nations. International Plant Genetic Resources Institute.
- García, L. C.; Lima de D. ( 2000): Storage behaviour of *Copaifera multijuga* seeds. *Acta Amazonica*. 30 (3): 369-365.
- Gómez- Campo, C. (2002). [Preservación a largo plazo de la semilla: el riesgo de usar los envases inadecuados es muy alto.](#) Monografías ETSIA, Universidad Politécnica de Madrid 163, 1-10 ([www.seedcontainers.net](http://www.seedcontainers.net)).
- Gómez-Campo C. (2006) Preservación a largo plazo de la semilla: los estándares actualizados son urgentes Monografías ETSIA, Univ. Politécnica de Madrid 168, 1-4.
- Hong, T. D. y R. H. Ellis (1996): A protocole to determine seed storage behaviour. Department of Agriculture, The University of Reading UK, 63 pp
- ISTA (1999) International rules for seed testing. *Seed Sci & Technol.*, 27, Supplement.
- Lerch, G. La experimentación en las ciencias Biológicas y Agrícolas. *Editorial Científico-Técnica*. La Habana. 452 pp. 1977.
- Maguire, J.D. (1962). Speed of germination-aid. In: Selection and evaluation for seedling emergence and vigour. *Crop Sci.*2: 176-177.
- Rajgopal, K. Y K. Chandran (2000): Storability of groundnut seeds in different packaging media. *International Arachis Newsletter*. No 20: 11-13.
- Socorro, A., Pérez, S., Martínez, E., Carbonell, M.V., Amaya, J.M. y Hernández, E. (2006): Efectos del tratamiento magnético de semillas en diferentes condiciones experimentales. *Revista del CENEA*. ....2006.
- Vertucci ,C.W. and Roos,EE.(1990) Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiology* 94,1019-1023
- Wu XM, NF Wu, XZ Quian, RG LI, FH Huang y L Zhu (1998): Phenotypic and genotypic changes in rapeseed alter 18 years of storage and regeneration. *Seed Science Research*, 8 (1): 55- 64.
- Zheng Xiao Y.; Li Xiu Q. y Ma Lian P.(2001): Research on freeze-drying and vaccum-drying of orthodox seeds for long-term storage. *IPGRI Newsletter for Asia, Pacific and Oceania*. No. 34, 22-23