

ALTERACIONES FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS EN SEMILLAS DE TRES CULTIVARES DE *Phaseolus vulgaris* DE ALTO Y BAJO VIGOR INDUCIDO ¹

Ramiro Alizaga *

ABSTRACT

Physiological and biochemical alterations in low and high induced vigor bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). Bean seeds of cultivars Rio Tibagi, Turrialba-4 and EMPASC-201 were artificially aged by storage in sealed plastic jars at 16% moisture content and 35°C. Seed samples were removed from storage at six-day intervals to obtain different vigor levels. The samples were submitted to standard germination test, 1000 seed weight test, aminoacid leakage, seed soluble sugars, aminoacids, and protein content, starch content and field emergence. Seed quality decreased during the storage period, EMPASC-201 seeds being the most deteriorated. Starch, soluble sugars and aminoacids contents were affected after 24 days of storage, whereas protein content was not. Aminoacid leakage tests correlated well with field emergence.

INTRODUCCION

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es uno de los alimentos básicos de muchos países. En Costa Rica, además de la relevancia económica, tiene importancia desde el punto de vista social, pues constituye la base energética y proteica en la dieta de un amplio sector de la población. Para suplir la creciente demanda por este grano, el uso de técnicas apropiadas de producción y el empleo racional de insumos, así como la utilización de semilla de alta calidad, son factores esenciales para la obtención de buenas cosechas.

La calidad de las semillas está determinada por aspectos genéticos, físicos, fisiológicos y sanitarios, que pueden ser evaluados con el propósito

de estimar si un lote de semillas es apropiado para fines de multiplicación. En este contexto, la calidad fisiológica y su evaluación ha sido uno de los aspectos más estudiados durante los últimos años, debido a que las semillas presentan el mayor nivel de calidad al momento de la madurez fisiológica (AOSA, 1983); sin embargo esa calidad no se mantiene y declina gradualmente como consecuencia del proceso de envejecimiento de las semillas, el cual acarrea una serie de transformaciones degenerativas.

El deterioro es un proceso que involucra la interacción de factores intrínsecos de la semilla con factores externos. Los intrínsecos corresponden a una serie de eventos de naturaleza bioquímica relacionados con agotamiento, transporte y utilización de sustancias nutritivas, síntesis de ATP, alteraciones de la actividad enzimática, degradación de moléculas de ADN e integridad y funcionamiento de estructuras celulares, especialmente las membranas celulares (Anderson, 1970; Koostra, 1973). Sin embargo, a pesar de la extensa evidencia acumulada sobre las diversas manifestaciones del deterioro asociadas con la

1/ Recibido para publicación el 27 de abril de 1989.

* Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Miembro del Programa Financiero de Apoyo a Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica.

reducción de la calidad de las semillas, y debido al limitado conocimiento con respecto a la secuencia en que ocurren estas alteraciones, aún no se ha determinado cuáles son causa y cuáles efecto del deterioro (AOSA, 1983).

Abdul-Baki y Anderson (1970; 1972) opinan que las alteraciones bioquímicas más importantes relacionadas con el deterioro son: disminución de la tasa respiratoria, aumento en la permeabilidad de las membranas celulares y reducción de la síntesis de polisacáridos y proteínas. Yaklich (1985) observó que semillas de soya con menor contenido de azúcares solubles presentaron menor vigor. El avance en el proceso de deterioro también puede ser observado durante la imbibición de las semillas, cuando sustancias solubles en agua tales como aminoácidos, carbohidratos de bajo peso molecular e iones, son lixiviados en mayor cantidad (Brower y Mulder, 1982). Los factores externos tales como estrés hídrico o deficiencias nutricionales en las plantas durante la formación de las semillas, calentamiento excesivo durante el secado, daños mecánicos y almacenamiento en condiciones inadecuadas, entre otros, afectan principalmente la intensidad y la velocidad del deterioro.

La prueba de germinación se correlaciona bien con la emergencia en campo cuando las condiciones ambientales son favorables, sin embargo, bajo condiciones adversas los resultados pueden diferir considerablemente. Por tanto, se hace necesario realizar pruebas de vigor que permitan diferenciar, cualitativamente, lotes de semillas que presenten porcentajes de germinación similares.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la eficiencia de varios indicadores cuantitativos de vigor para evaluar la calidad fisiológica de semillas de frijol, así como determinar su relación con la emergencia en campo.

MATERIALES Y METODOS

Tratamientos

Se utilizaron semillas de frijol de los cultivares Río Tibagí, Turrialba-4 y EMPASC-201 con porcentajes de germinación superiores a 90%. Para obtener una humedad inicial uniforme, 5 muestras de 2 kg de semilla de cada cultivar fueron colocadas en una cámara húmeda hasta que alcanzaran 16% de humedad. Seguidamente, con el fin de obtener 5 niveles de vigor diferentes que

se denominaron 1, 2, 3, 4 y 5 (ordenados de mayor a menor vigor), las semillas de cada cultivar fueron almacenadas en recipientes de plástico durante 0, 6, 12, 18 y 24 días, respectivamente, a 35°C. Transcurridos los períodos correspondientes, se redujo el porcentaje de humedad de las semillas hasta aproximadamente 12% mediante una corriente de aire a temperatura ambiental.

Pruebas de laboratorio

Porcentaje de germinación. Se realizó en un germinador graduado a temperatura constante de 25°C, según el método de ISTA (1976), excepto en cuanto al número de semillas, ya que se usaron 4 repeticiones de 50.

Peso de mil semillas. De cada nivel de vigor se tomaron al azar 4 repeticiones de mil semillas. Para uniformar los resultados, el peso de las semillas se ajustó a un porcentaje de humedad teórico de 12%.

Lixiviación de aminoácidos. De cada cultivar se usaron 4 repeticiones de 50 semillas por nivel de vigor y se colocaron en 50 ml de agua destilada a 25°C, durante 4 h. Posteriormente, se determinó la cantidad de aminoácidos en la solución ($\mu\text{g/ml/g}$ de semilla), utilizando la metodología descrita por Ching (1986).

Composición química de las semillas. De cada nivel de vigor se utilizaron aproximadamente 20 g de semillas que se molieron y tamizaron a través de una malla con perforaciones de 0,55 mm de diámetro. Las determinaciones del contenido de almidón, azúcares solubles, aminoácidos solubles y proteínas solubles se realizaron según la metodología propuesta por Ching (1986). Los resultados se expresaron en términos de porcentaje por semilla.

Prueba de campo

De cada cultivar se sembraron 4 repeticiones de 100 semillas por nivel de vigor, a una profundidad de 4 cm. La distancia entre líneas fue de 50 cm y se colocaron 15 semillas por metro lineal. La evaluación de las plántulas, en términos de porcentaje de emergencia, se realizó a los 14 y a los 21 días después de iniciado el ensayo.

Análisis estadístico

En las pruebas de laboratorio se usó un diseño irrestricto al azar, con un arreglo factorial AxB con 4 repeticiones, donde A correspondió a los cultivares y B a los niveles de vigor. En la

prueba de emergencia en campo se utilizó un diseño de bloques completos al azar, con el mismo arreglo factorial antes descrito.

En cada una de las pruebas realizadas, las medias obtenidas en los diferentes niveles de vigor se compararon mediante la prueba de rango múltiple de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSION

Porcentaje de germinación

Los resultados obtenidos en la prueba de germinación (Cuadro 1) muestran que la reducción en el nivel de vigor afectó el porcentaje de germinación de los cultivares Río Tibagí y EMPASC-201 a partir del nivel de vigor 3, mientras que en el cultivar Turrialba-4 prácticamente no hubo efecto.

En el cultivar Río Tibagí la prueba de germinación permitió una buena valoración de las diferencias de calidad en las semillas; sin embargo, en general la prueba no mostró un grado de

sensibilidad suficiente como para detectar las diferencias en la calidad fisiológica de las semillas según el nivel de vigor. Esto probablemente se debe a que la prueba se realizó sobre condiciones ideales de humedad, temperatura y sustrato, lo que permitió que semillas de bajo vigor se comportaran en forma similar a otras de mayor vigor. Resultados semejantes han sido señalados por Roos y Manalo (1971) en frijol.

Peso de mil semillas

En los cultivares Río Tibagí y Turrialba-4 hubo una pequeña disminución en el peso de mil semillas (Cuadro 2) conforme aumentó el período de almacenamiento en condiciones adversas (niveles de vigor), posiblemente debido a la actividad metabólica de las semillas. Sin embargo, esta prueba fue absolutamente insensible para diferenciar estadísticamente entre las semillas de mayor y de menor vigor. Las diferencias significativas en el peso de mil semillas observadas entre los cultivares se debieron al factor genético; al respecto Santos *et al.* (1988) verificaron que las semillas del cultivar EMPASC-201 son más pesadas que las de Río Tibagí, y éstas más pesadas que las de Turrialba-4.

Lixiviación de aminoácidos

Las pruebas de vigor basadas en la lixiviación de solutos a través de las membranas celulares, han sido utilizadas con éxito en la evaluación del vigor de semillas de soya (Miranda, 1981), de arveja (Mullett y Wilkinson, 1979) y de frijol (Brower y Mulder, 1982). En el presente estudio, puede observarse (Cuadro 3) que conforme se redujo el vigor hubo un aumento en la pérdida de aminoácidos por parte de las semillas en los 3 cultivares. De la misma forma, Edje y Burris (1970) constataron que con el avance en el deterioro de

Cuadro 1. Porcentaje de plántulas normales obtenido con la prueba de germinación en semilla de 3 cultivares de frijol con diferentes niveles de vigor.

Cultivar	Niveles de vigor					\bar{X}
	1	2	3	4	5	
R. Tibagí	93 a	93 a	89 a	84 b	78 c	87
Turrialba-4	93 a	88 b	91 ab	90 ab	91 ab	91
EMPASC-201	96 a	95 a	89 b	88 b	87 b	91
\bar{X}	94	92	90	87	85	

Medias seguidas de la misma letra en la línea, no difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) según la prueba de Duncan.

Cuadro 2. Peso de 1000 semillas (g) de 3 cultivares de frijol con diferentes niveles de vigor.

Cultivar	Niveles de vigor					\bar{X}
	1	2	3	4	5	
R. Tibagí	183,6	183,1	182,7	182,4	181,7	182,7 b
Turrialba-4	180,5	180,7	179,6	180,9	179,0	180,1 c
EMPASC-201	187,5	187,1	187,3	187,0	186,8	187,1 a
\bar{X}	183,9 a	183,6 a	183,2 a	183,4 a	182,5 a	

Medias seguidas de la misma letra en las líneas y columnas, no difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) según la prueba de Duncan.

Cuadro 3. Lixiviación de aminoácidos ($\mu\text{g/ml/g}$ de semilla) obtenida luego de 4 horas de imbibición en semillas de 3 cultivares de frijol con diferentes niveles de vigor.

Cultivar	Niveles de vigor					\bar{X}
	1	2	3	4	5	
R. Tibagí	25,63 d	27,00 d	63,30 c	96,98 b	115,66 a	65,71
Turrialba-4	65,26 b	65,41 b	80,85 a	89,80 a	88,95 a	78,07
EMPASC-201	15,61 c	16,96 c	28,13 b	48,54 a	50,06 a	31,86
\bar{X}	35,50	36,46	57,43	78,44	84,89	

Medias seguidas de la misma letra en las líneas, no difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) según la prueba de Duncan.

semillas de soya, ocurrió un aumento en la permeabilidad de las membranas celulares, lo que causó una mayor lixiviación de aminoácidos y azúcares. En los cultivares Río Tibagí y EMPASC-201 la prueba de lixiviación permitió una buena separación de los diferentes niveles de vigor, mientras que en Turrialba-4 la prueba fue menos eficiente. Además, se determinó un comportamiento diferencial entre cultivares, ya que EMPASC-201 mostró una lixiviación de aminoácidos sustancialmente menor a la observada en los otros 2 genotipos. En general, los resultados obtenidos coinciden con la opinión de Chauhan *et al.* (1984) y de Bewley (1986), para quienes la lixiviación de compuestos citoplasmáticos cuando las semillas son colocadas en agua, puede atribuirse a alteraciones en la configuración de las membranas celulares, debido a que el deterioro provoca daños en el mecanismo de restauración de las mismas.

Composición química

El Cuadro 4 muestra la concentración de almidón, de azúcares solubles y de proteínas y aminoácidos solubles en semillas de frijol de los niveles de vigor 1, 3 y 5, pues se omitieron los resultados de los niveles 2 y 4 debido a la poca variación observada en el contenido de estos compuestos. La concentración de almidón en el cultivar EMPASC-201 fue significativamente superior a la obtenida en los otros 2 cultivares, los que a su vez no difirieron entre sí. Además, se obtuvo una reducción en el contenido de almidón en semillas del nivel de vigor 5.

Con respecto a la concentración de azúcares solubles, el cultivar EMPASC-201 mostró contenidos significativamente menores que Turrialba-4 y Río Tibagí. Por otra parte, la concentración de estos carbohidratos no varió significativamente en

los niveles de vigor 1 y 3, mientras que en el nivel 5 hubo un aumento significativo. Esta conversión del almidón en azúcares solubles de menor peso molecular y mayor solubilidad, se debe, probablemente, a su utilización en el proceso respiratorio de las semillas. A pesar de los resultados obtenidos, no se puede afirmar que el bajo vigor de las semillas almacenadas durante 24 días (vigor 5) se deba únicamente a la reducción en el contenido de almidón, aunque parece haber una relación directa entre ambos fenómenos. Al respecto, Abdul-Baki (1980) considera que la mayoría de las semillas almacenan más reservas de las que normalmente necesitan para germinar y producir una planta, y que por tanto, el vigor de las semillas está estrechamente relacionado con la integridad de los mecanismos de biosíntesis. Asimismo, Edje y Burris (1970) concluyeron que la reducción en el contenido de carbohidratos en semillas deterioradas de soya, fue relativamente pequeña como para considerarla la causa principal de la pérdida del vigor.

La concentración de proteínas solubles no varió significativamente entre cultivares ni entre niveles de vigor; por el contrario, la concentración de aminoácidos solubles sí (Cuadro 4). Sin embargo, la magnitud de las diferencias observadas es muy pequeña como para relacionarla concretamente con la calidad fisiológica de las semillas.

Prueba de campo

Los resultados obtenidos en la prueba de emergencia en condiciones de campo (Cuadro 5), muestran que como consecuencia de la reducción del vigor de las semillas, hubo una disminución en el porcentaje de emergencia de plántulas en los 3 cultivares. El desempeño de los genotipos fue

Cuadro 4. Composición química de semillas de 3 cultivares de frijol con diferentes niveles de vigor.

Componente (%)	Cultivar	Niveles de vigor			\bar{X}
		1	3	5	
Almidón	R. Tibagí	23,78	23,30	18,30	21,79 B
	Turrialba-4	23,82	24,95	22,30	23,62 B
	EMPASC-201	38,85	39,09	32,10	36,68 A
	\bar{X}	28,28 A	29,11 A	24,23 B	
Azúcar soluble	R. Tibagí	3,10	2,78	3,32	3,07 A
	Turrialba-4	2,78	2,74	3,25	2,92 A
	EMPASC-201	2,34	2,44	2,47	2,42 B
	\bar{X}	2,74 A	2,65 B	3,01 A	
Proteínas solubles	R. Tibagí	0,75	0,77	0,76	0,76 A
	Turrialba-4	0,78	0,78	0,76	0,77 A
	EMPASC-201	0,78	0,77	0,75	0,77 A
	\bar{X}	0,77 A	0,77 A	0,76 A	
Aminoácidos solubles	R. Tibagí	0,16 ab	0,18 a	0,15 b	0,16
	Turrialba-4	0,14 a	0,14 a	0,11 b	0,13
	EMPASC-201	0,09 b	0,10 ab	0,11 a	0,10
	\bar{X}	0,13	0,14	0,12	

Medias seguidas de la misma letra mayúscula o minúscula en las líneas y de la misma letra mayúscula en las columnas no difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) según la prueba de Duncan.

Cuadro 5. Porcentaje de emergencia en campo obtenido en semillas de 3 cultivares de frijol con diferentes niveles de vigor.

Cultivar	Niveles de vigor					\bar{X}
	1	2	3	4	5	
R. Tibagí	88 a	85 a	82 ab	77 b	76 c	82
Turrialba-4	89 a	86 ab	82 b	84 ab	74 c	83
EMPASC-201	87 a	85 a	83 a	71 b	62 c	78
\bar{X}	88	85	82	77	71	

Medias seguidas de la misma letra en las líneas, no difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$) según la prueba de Duncan.

similar en los niveles de vigor 1, 2 y 3, ya en los niveles de vigor inferiores (4 y 5) el porcentaje de emergencia del cultivar EMPASC-201 fue significativamente menor, posiblemente debido a que éste fue más susceptible a las condiciones adversas de almacenamiento a las que se sometieron las semillas, con el objetivo de obtener los diferentes niveles de vigor.

Uno de los aspectos que más interfiere en la evaluación del vigor es la variabilidad existente

entre diferentes lotes de semillas, provocada por factores como condiciones de cosecha, beneficiamiento, secado y otros. En este trabajo, dicha variación fue eliminada, pues se usó un mismo lote de semillas en cada cultivar. Por lo tanto, la única diferencia entre las muestras fue la variación en la calidad fisiológica de las semillas causada por los diversos períodos de almacenamiento en condiciones adversas. Sin embargo, sólo fue posible obtener una clara diferenciación entre las

muestras de semillas de mayor y de menor calidad fisiológica, con las pruebas de lixiviación de aminoácidos y de emergencia a campo.

Se considera que la prueba de germinación presenta serias limitaciones para evaluar adecuadamente la calidad fisiológica de las semillas, por lo tanto, resulta conveniente realizar pruebas de vigor que complementen la información obtenida en la prueba de germinación y que permitan estimar con mayor propiedad el posible desempeño de las semillas en el campo. Esto quedó demostrado en el presente trabajo, pues a pesar de que los porcentajes de germinación en general fueron altos, la prueba de emergencia evidenció diferencias considerables en cuanto al porcentaje de plántulas producidas, especialmente entre las semillas con alto y bajo vigor.

RESUMEN

Semillas de frijol de los cultivares Río Tibagí, Turrrialba-4 y EMPASC-201 con 16% de humedad, fueron deterioradas en diferentes grados, almacenándolas a 35°C en recipientes de plástico cerrados. Las muestras de semillas se retiraron del almacenamiento a intervalos de 6 días para obtener 5 diferentes niveles de vigor y se sometieron a las pruebas de germinación, peso de mil semillas, lixiviación de aminoácidos, contenido de azúcares, de aminoácidos y de proteínas solubles, contenido de almidón y emergencia en campo. La calidad de las semillas se redujo durante el almacenamiento, principalmente la del cultivar EMPASC-201. El contenido de almidón y de azúcares y aminoácidos solubles se afectó después de 24 días de almacenamiento, mientras que el contenido de proteínas solubles no se alteró. En general, conforme se redujo el nivel de vigor de las semillas aumentó la lixiviación de aminoácidos y disminuyó el porcentaje de emergencia a campo.

LITERATURA CITADA

- ABDUL-BAKI, A.A. 1980. Biochemical aspects of seed vigour. *HortScience* 15(6):765-771.
- ABDUL-BAKI, A.A.; ANDERSON, J.D. 1972. Physiological and biochemical deterioration of seeds. *In Seed Biology*. Ed. by T. Kozlowski. New York, Academic Press. p. 283-315.
- ABDUL-BAKI, A.A.; ANDERSON, J.D. 1973. Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Science* 13(6):630-633.
- ANDERSON, J.D. 1973. Metabolic changes associated with senescence. *Seed Sci. Technol.* 1(2):401-416.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. 1983. *Seed vigour testing handbook*. No. 32. 88 p.
- BEWLEY, D.J. 1986. Membrane changes in seeds as related to germination and the perturbations resulting from deterioration in storage. *In Physiology of Seed Deterioration*. Ed. by M.B. McDonald and C.J. Nelson. Wisconsin, Crop Science Society of America. p. 27-45.
- BROWER, H.M.; MULDER, J.C. 1982. Reduced steeping time for the conductivity vigor test of *Phaseolus vulgaris* L. seed. *J. Seed Technol.* 7(11):84-91.
- CHAUHAN, K.P.; PURKAR, J.K.; BANERJEE, S.K. 1984. Ageing induced changes in seeds. *Seed Res.* 12(1):56-68.
- CHING, T.M. 1973. Biochemical aspects of seed vigor. *Seed Sci. Technol.* 1(1):73-88.
- CHING, T.M. 1986. Fisiologia do desenvolvimento da semente. Pelotas, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pelotas. (mimeografiado).
- EDJE, O.T.; BURRIS, J.S. 1970a. Seedling vigor in soybeans. *Proc. Assoc. Off. Seed Anal.* 60:149-157.
- EDJE, O.T.; BURRIS, J.S. 1970b. Physiological and biochemical changes in deteriorating soybean seeds. *Proc. Assoc. Off. Seed Anal.* 60:158-168.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 1976. International rules for seed testing. *Seed Sci. Technol.* 4(1):1-77.
- KOOSTRA, P. 1973. Changes in seed ultrastructure during senescence. *Seed Sci. Technol.* 1(2):417-425.
- MIRANDA, M. 1981. Evaluation of an electrical conductivity method for rapidly estimating germination and assessing deterioration of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seed. Ph.D. Thesis. Mississippi, Mississippi State University. 96 p.
- MULLETT, J.H.; WILKINSON, R.I. 1979. The relationship between amounts of electrolyte lost on leaching seeds of *Pisum sativum* and some parameters of plant growth. *Seed Sci. Technol.* 7(3):393-398.

ROOS, E.E.; MANALO, J.R. 1971. Testing vigor of beans following unfavorable storage conditions. HortScience 6(4):347-348.

SANTOS, M.M.; ANDRIGETO, J.R.; CAMARGO, C.P.; GOEPFERT, F.J. 1988. Descrição de cultivares de

feijão. Brasília, Secretaria Nacional de Produção Agropecuária. 50 p.

YAKLICH, R.W. 1985. Effect of ageing on soluble oligosaccharide content in soybean seeds. Crop Sci. 25(4):701-704.