

## EFFECTO DE LA CIANAMIDA HIDROGENADA EN LA SEMILLA DE CAFE (*Coffea arabica*) cv. CATURRA. II. INFLUENCIA SOBRE EL METABOLISMO GERMINATIVO<sup>1</sup>

Eric Guevara\*  
Jorge Herrera\*  
Ramiro Alizaga\*

### ABSTRACT

**Effect of hydrogen cyanamide on coffee seed (*Coffea arabica*) cv. Caturra. II. Influence on metabolic parameters of germination.** The interaction of several immersion periods and doses of hydrogen cyanamide (HC), on its own and in combination with gibberellic acid (AG<sub>3</sub>), was evaluated on coffee seeds with and without endosperm. Concentrations of HC of 0.0075 and 0.001% (50% a.i.) and immersion periods of 5 and 20 min proved to be useful in promoting seed germination. The levels of CO<sub>2</sub> in sealed flasks for one or more days showed gradual diminishing values of this gas during the first 8 days. In the presence of HC, CO<sub>2</sub> values were lower. Higher values were found after 10 days. In the case of seed stored for 5 months the lowest values were found after 10 and 12 days. These lowest values coincide with the end of the germination phase *sensu stricto*. The interaction of HC and AG<sub>3</sub> promoted germination, specially after long immersion periods. The effect of HC and water on germination of coffee seeds, as well as their interaction with AG<sub>3</sub>, are discussed.

### INTRODUCCION

La investigación realizada con semilla de café ha permitido comprender gran parte de los factores, principalmente mecánicos y físicos, que afectan la germinación de la misma (Bendaña, 1962; Valio 1980). Sin embargo, la mayoría de estos experimentos se centraron principalmente en estudiar los posibles obstáculos a la germinación, por lo que, hasta el momento, el proceso de germinación en sí, ha sido poco caracterizado. Este comentario es igualmente válido para las

diferentes sustancias evaluadas, con las cuales se busca en general demostrar su efecto estimulatorio o inhibitorio sobre la germinación final de las semillas.

Herrera *et al.* (1989) mostraron que la cianamida hidrogenada (CH) provoca, cuando se utiliza en altas concentraciones (>1% i.a.), una disminución de la germinación de la semilla de café. En dosis más bajas (0,5-1%), la presencia o ausencia del pergamino así como la humedad de la semilla resultaron en modificaciones importantes de la respuesta a la CH, lo que sugiere una posible relación entre estos parámetros.

Por otra parte, observaciones hechas en papa (Guevara y Herrera, 1989) y en maní (Alizaga *et al.*, 1990) con niveles de CH bajos (<0,25% i.a.) sugieren la posibilidad de que el uso de bajas concentraciones de esta sustancia tendrían un efecto estimulatorio en la activación metabólica de la semilla. El hecho de que embrión-

1/ Recibido para su publicación el 24 de setiembre de 1991.

\* Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Los autores son miembros del programa de apoyo financiero a investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica.

nes aislados tempranamente pudieran desarrollarse aún con dosis de CH superiores al 2% i.a. va en favor de esta hipótesis (Herrera *et al.*, 1990).

Se evidencia así que es necesario un mejor conocimiento del metabolismo de la semilla, con el fin de tener un mayor control del proceso germinativo, de especial importancia en plantas agrícolas (Bendaña, 1962; Osei-Bonsu *et al.*, 1989).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la expresión de varios parámetros del metabolismo de la semilla de café, en presencia de niveles bajos de CH con el fin de ampliar el conocimiento sobre los efectos de la sustancia sobre la germinación.

## MATERIALES Y METODOS

Los experimentos se realizaron en las instalaciones del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica.

Se utilizó semilla del cultivar "Caturra" procedente del Centro para Investigaciones en Café (CICAFE). Esta fue secada hasta alcanzar 40% de humedad y fue almacenada a 20°C durante el transcurso de toda la investigación.

Todos los experimentos se dispusieron en un diseño irrestricto al azar.

### Germinación de semillas con y sin pergamino

**Experimento I.** Se realizaron tratamientos de inmersión, tanto de semillas con y sin pergamino (endocarpo) por 0, 5, 10 y 15 min en soluciones de cianamida hidrogenada ( $\text{CH}_2\text{N}_2$ , CH), en concentraciones de 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 y 1% de la formulación comercial (50% i.a). Posterior a la inmersión, la semilla fue colocada sobre una bandeja entre 2 láminas de papel para germinación o previamente humedecido, y en una cámara a 30°C y 98% de humedad relativa. En el caso de la semilla sin pergamino, se evaluó el porcentaje de germinación (radícula superior a 2 mm de longitud) a partir del quinto día. Se realizó recuentos cada 48 h hasta completar un período de 2 semanas. Se determinó el peso de las plántulas a los 17, 21 y 28 días después de iniciado el experimento. En el caso de las semillas con pergamino, la evaluación se inició después de 7 días. Se efectuaron determinaciones cada 48

h por un período de 4 semanas. En ambos tipos de semilla cada tratamiento constó de 4 repeticiones de 50 semillas.

**Experimento II.** En un segundo experimento se utilizó únicamente semilla con pergamino. Las soluciones de CH empleadas fueron 0, 0,005, 0,0075, 0,01, 0,025, 0,05 y 0,1 de la formulación comercial antes citada, durante períodos de inmersión de 5, 10, 15 y 20 min. La semilla fue colocada sobre papel de germinación, de la misma manera descrita anteriormente. Se evaluó el porcentaje de semilla germinada a los 7, 10, 13 y 21 días. La evolución del peso seco de las plántulas fue evaluada entre los 22 y 37 días después de iniciado el experimento. En este caso cada tratamiento constó de 4 repeticiones de 25 semillas cada una.

**Experimento III.** Igual que en el experimento anterior, se utilizó únicamente semillas con pergamino. Las inmersiones fueron de 15 min en soluciones de CH de 0,005 y 0,01% de la formulación comercial, combinadas o no con una solución de  $\text{AG}_3$  en una concentración de 5 mg/L. Posteriormente, la semilla fue sumergida por períodos de 0 y 6 h en agua, después de lo cual fue puesta a germinar de acuerdo al procedimiento descrito previamente, con la excepción de que la semilla no fue recubierta con papel de germinación. Se evaluó la germinación según el método empleado anteriormente y el peso seco se determinó al finalizar el experimento. Cada tratamiento constó de 4 repeticiones de 50 semillas.

### Determinación de los niveles de $\text{CO}_2$ durante el proceso de germinación de la semilla con pergamino

Se determinó el porcentaje de  $\text{CO}_2$  liberado por las semillas durante la germinación. Se efectuaron 2 experimentos:

**Experimento A.** La semilla se colocó por 15 min en soluciones de CH de 0, 0,005, 0,01 y 0,05% de la formulación comercial. Posterior al tratamiento, las semillas fueron depositadas en erlenmeyers de 250 ml, en el fondo de los cuales se colocaron 2 capas de papel de germinación previamente humedecido con aproximadamente 8 ml de agua. Los erlenmeyers fueron sellados herméticamente a presión con tapones de corcho recubiertos con papel aluminio, para evitar pérdidas de  $\text{CO}_2$  entre mediciones. Las determinaciones de  $\text{CO}_2$  fueron hechas con un analizador de gases infrarrojo Riken modelo RI-550A. El material

experimental fue dividido en 2 condiciones para efectuar 2 tipos de mediciones: 1) cada 2 días después de iniciado el experimento, hasta completar un período de 16 días; 2) a frascos que permanecieron sellados durante 4, 6, 8 y 10 días. En ambos casos, una vez realizada la medición del gas, el frasco fue nuevamente sellado. Además, al final del experimento se evaluó el porcentaje de germinación y el peso seco de las plántulas.

**Experimento B.** Se efectuaron inmersiones por 15 min en soluciones de CH al 0, 0,005% y 0,01% de la formulación comercial y de AG<sub>3</sub> en una concentración de 5 mg/L. Seguidamente, la semilla se sumergió por 0 y 6 h en agua, y se colocó en erlenmeyers de 125 ml, según el procedimiento descrito en el experimento anterior. Las mediciones se hicieron cada 2 días. Cada tratamiento constó de 4 repeticiones de 25 semillas. Otras mediciones incluyeron el porcentaje final de germinación, así como el peso de las plántulas.

## RESULTADOS

### Efecto de los tratamientos y los tiempos de inmersión sobre la germinación

**Dosis altas de CH.** La Figura 1 muestra la germinación de semillas de café previamente despergamizadas. Se notan porcentajes semejantes entre el testigo y la dosis de 0,01% de CH. No se detectaron diferencias significativas de los tiempos de inmersión. Con dosis superiores al 0,01% de CH se observó un marcado efecto inhibitorio

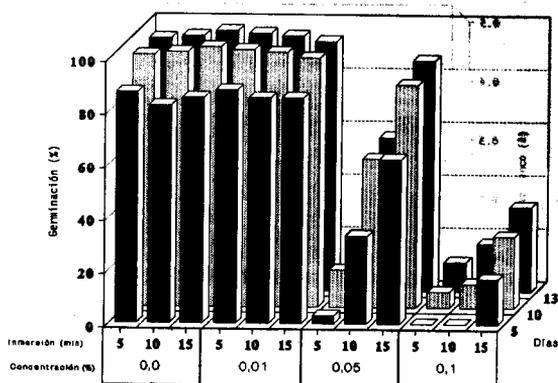


Fig. 1. Efecto de concentraciones y períodos de inmersión en cianamida hidrogenada (50% i.a.) sobre la germinación de semillas de café sin pergamino.

sobre la germinación, al punto que las semillas tratadas con las dosis de 0,5% y 1% no germinaron del todo, por lo cual no se incluyeron en la figura. Con las concentraciones de 0,05% y 0,1% se detectó un marcado atraso en la germinación, especialmente con la segunda dosis. El tiempo de inmersión causó efectos significativos, observándose una mayor germinación con tiempos de 15 min. Al evaluar el peso seco de las plantas (Figura 2) se nota que esta tendencia se mantiene, siendo una vez más el factor de inmersión crítico cuando las dosis de CH utilizadas son superiores al 0,01%.

No se incluyen los resultados obtenidos en semillas con pergamino debido a que se obtuvo una germinación sumamente errática y escasa, debido a factores desconocidos.

**Dosis bajas de CH.** Con base en los resultados obtenidos en semillas despergamizadas se procedió a estudiar el efecto de niveles de CH inferiores a los aplicados, así como tiempos de inmersión mayores en semillas con pergamino. En la Figura 3 se nota una germinación más lenta en presencia de CH, pues apenas se obtuvo un 80% de germinación después de 20 días, en comparación con los 5 días que duró en ausencia del pergamino (caso del testigo). La presencia de CH estimuló ligeramente la germinación cuando los niveles aplicados fueron de 0,0075% o superiores. Este estímulo fue observado a partir de los 7 días. Después de 20 días el efecto del tiempo de inmersión inicial sobre el % de germinación dejó de ser aparente. Con excepción de la concentración al 0,005% de CH, no se notaron diferencias significativas sobre la

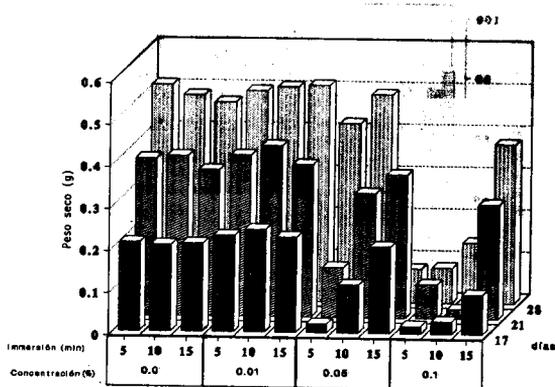


Fig. 2. Efecto de períodos de inmersión en soluciones de diferente concentración de cianamida hidrogenada (50% i.a.) sobre el peso seco de plántulas de café.

germinación entre los demás niveles aplicados. Nuevamente, la evolución del peso seco de las plántulas (Figura 4), muestra un comportamiento similar con respecto al observado en la germinación. Aunque estadísticamente no fueron diferentes, se pudo notar un ligero incremento en la materia seca al utilizar niveles de CH comprendidos entre 0,0075% y 0,01%. Por el contrario, semillas tratadas con dosis de 0,005% tienden a mostrar el menor peso seco. Es interesante hacer notar que el incremento de peso entre los 22 y 29 días fue bajo, mientras que el aumento fue muy fuerte a partir de los 33 días.

Con base en los resultados obtenidos se procedió a evaluar en experimentos posteriores concentraciones de CH comprendidas entre 0,005% y 0,01% y su interacción con el AG<sub>3</sub>, así como períodos prolongados de inmersión en agua. Al emplear CH (Figura 5a) se observó un efecto detrimental del período de inmersión prolongada en agua posterior al tratamiento, pues llegó a obtenerse únicamente 49% de las semillas germinadas después de 34 días. Tanto el testigo como el tratamiento al 0,005% de CH en semillas sumergidas por períodos prolongados mostraron un considerable atraso en la germinación. En ausencia del proceso de inmersión los valores de germinación fueron superiores al 90% en ese mismo período. En presencia de CH+AG<sub>3</sub>, el efecto del período de inmersión fue menos pronunciado (Figura 5b), pero las diferencias fueron mayores con respecto a la concentración de CH empleada. Con la combinación de AG<sub>3</sub>+CH al 0,01% se obtuvo porcentajes mayo-

res de germinación a los 14 y 18 días, alcanzado valores superiores al 80% después de los 22 días. La inmersión prolongada en agua retardó la germinación cuando se usó AG<sub>3</sub> conjuntamente con 0,005% de CH. Empleado solo, el AG<sub>3</sub> produjo una velocidad de germinación menor. Excepción hecha del tratamiento de AG<sub>3</sub>+CH al 0,005% sin imbibición posterior, la germinación de todos los tratamientos fue superior al 80%, sin observarse diferencias significativas entre ellos.

**Evolución de la producción de CO<sub>2</sub> durante el proceso de germinación y crecimiento**

La Figura 6 muestra la evolución de los niveles de CO<sub>2</sub> determinados en semillas tratadas con diferentes concentraciones de CH. En todos los casos se puede observar una tendencia similar, una fuerte disminución de los niveles de CO<sub>2</sub> entre el día 4 y el 8, después de lo cual su concentración se incrementa nuevamente. La Figura 7 muestra la evolución de los niveles de CO<sub>2</sub> cuando los frascos permanecieron sellados por períodos comprendidos entre 2 y 10 días. Puede notarse que, al igual que en el caso de los frascos abiertos regularmente, el nivel de CO<sub>2</sub> en los frascos sellados alcanza su punto más bajo el día 8.

La germinación del testigo fue relativamente uniforme independientemente del tiempo transcurrido antes de la apertura del frasco (Figura 8). La aparición de la radícula se observó en los frascos 8 días después de iniciado el experimento.

Con los niveles de 0,005 y 0,01% de CH, los niveles más altos de germinación se alcanzaron a

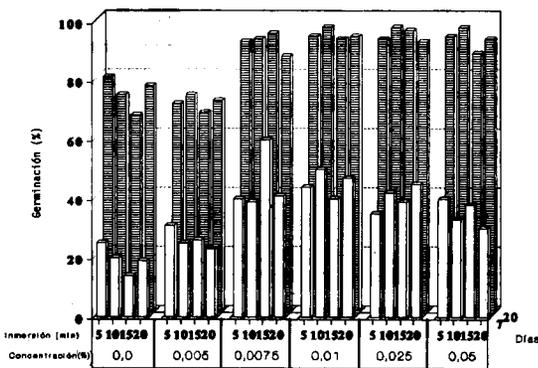


Fig. 3. Efecto de la interacción entre dosis bajas de cianamida hidrogenada (50% i.a.) y períodos de inmersión sobre la germinación de semillas de café con pergamino.

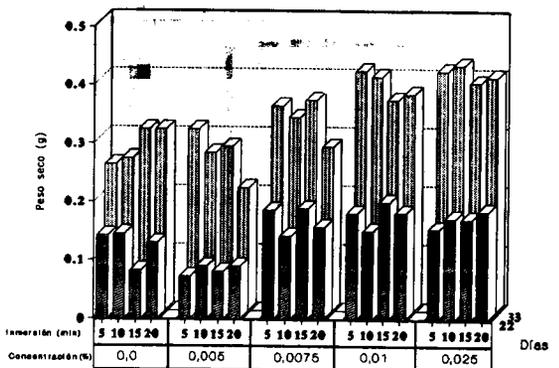


Fig. 4. Efecto de la interacción entre dosis bajas de cianamida hidrogenada (50% i.a.) y períodos de inmersión sobre el peso seco de plántulas de café provenientes de semilla con pergamino.

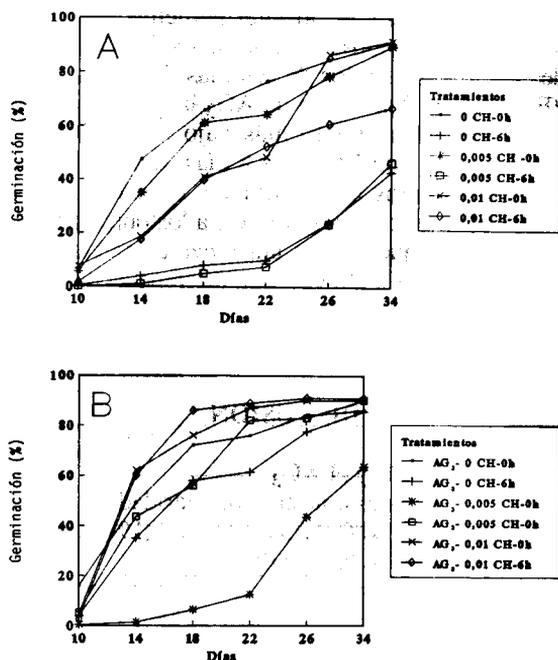


Fig. 5. Efecto de dos reguladores metabólicos y de la inmersión en agua (0h, 6h) posterior al tratamiento, sobre la germinación de semilla de café almacenada por 10 meses. A. Cianamida hidrogenada (CH). B. Cianamida hidrogenada más ácido giberélico (AG<sub>3</sub> 5 mg/L).

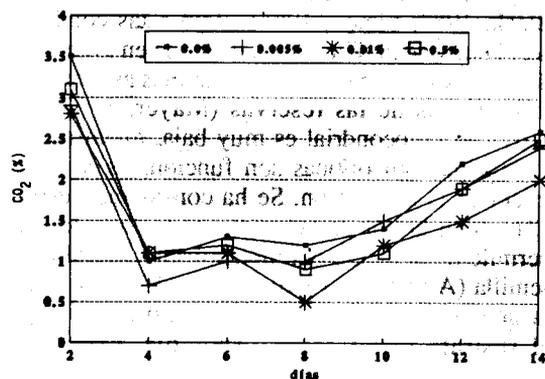


Fig. 6. Evolución de los niveles de CO<sub>2</sub> liberado por semillas de café tratadas con varias concentraciones de cianamida hidrogenada (50% i.a.)

los 6 días. Hubo disminución en los días anteriores y posteriores. Con niveles de CH al 0,5%, la germinación decreció conforme se prolongó el tiempo de sellado del frasco.

La Figura 9 (a,b) muestra el efecto producido por la interacción entre bajas concentraciones

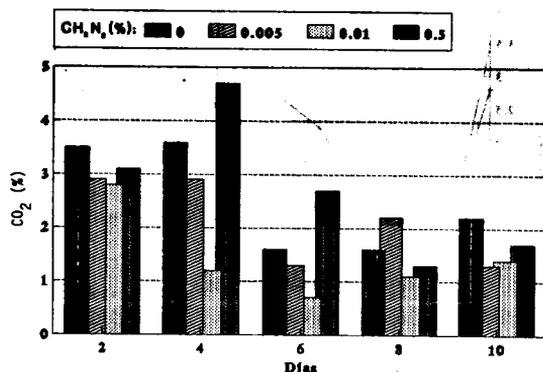


Fig. 7. Evolución de los niveles de CO<sub>2</sub> liberados durante la germinación de semillas de café tratadas con varias dosis de cianamida hidrogenada (CH<sub>2</sub>H<sub>2</sub>). Evaluaciones hechas en frascos abiertos sólo en la fecha indicada.

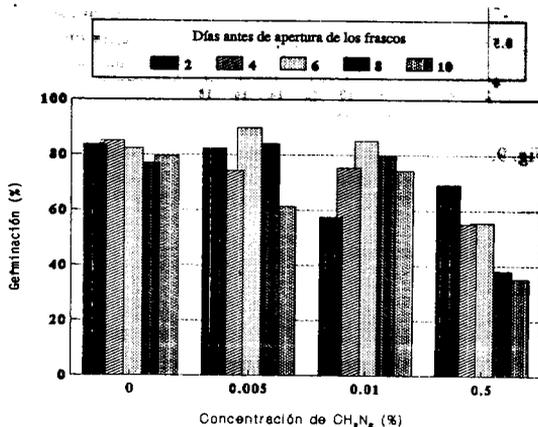


Fig. 8. Efecto de la interacción entre el día de apertura de los frascos y la dosis de cianamida hidrogenada sobre la germinación de semillas de café con pergamino.

de CH, AG<sub>3</sub> y períodos de inmersión en agua de 0 y 6 h sobre la evolución de los niveles de CO<sub>2</sub>. Durante todo el período evaluado se observó una menor liberación de CO<sub>2</sub> en semillas almacenadas por períodos largos (10 meses) en comparación con períodos cortos (5 meses).

Tanto el tratamiento testigo como el tratamiento con AG<sub>3</sub> presentaron su mayor disminución en la producción de CO<sub>2</sub> a los 8 días (Figura 9a), similar a lo observado en la Figura 6.

Las mayores diferencias en la producción de CO<sub>2</sub> entre las semillas almacenadas por 5 y 10

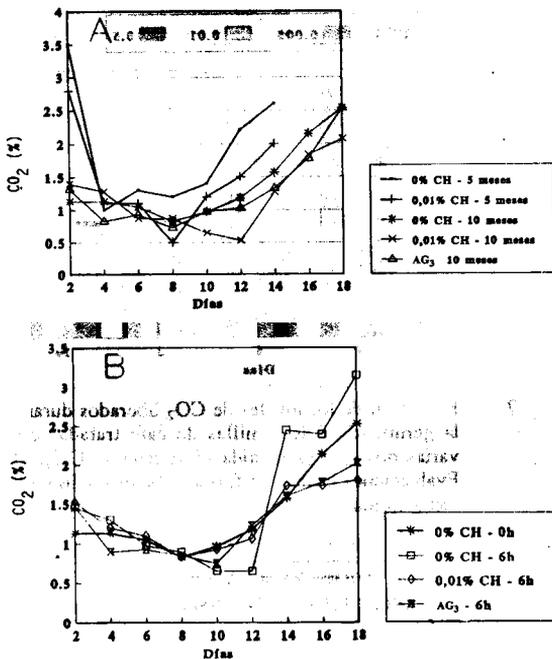


Fig. 9. A. Efecto de la cianamida hidrogenada (CH) y del ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) sobre la evolución de CO<sub>2</sub> en semillas de café almacenadas por 6 y 10 meses. B. Efecto del período de inmersión (0 y 6 h) sobre la evolución de CO<sub>2</sub>.

meses se observaron en los primeros 2 días (Figura 9a) debido a que períodos mayores de almacenamiento mostraron una menor liberación inicial. En general, los niveles de CO<sub>2</sub> durante los primeros 8 días mostraron una disminución progresiva, que volvió a aumentar a partir del décimo día. En ese momento la producción de CO<sub>2</sub> se incrementó rápidamente, aunque el aumento fue menor en las semillas almacenadas durante 10 meses. Las semillas tratadas con AG<sub>3</sub> mostraron un comportamiento similar al testigo, mientras que con el empleo de CH al 0,01% el incremento de CO<sub>2</sub> se retardó. Por lo tanto, existen diferencias marcadas con respecto a la edad de la semilla; en el caso de un almacenamiento de 10 meses, el menor pico de producción de CO<sub>2</sub> se produjo a los 12 días, o sea 4 días más tarde que en el caso de semilla almacenada por 5 meses.

Con inmersión prolongada de 6 h (Figura 9b), la disminución de los niveles de CO<sub>2</sub> muestra variaciones en función del tratamiento químico empleado. Así, el CO<sub>2</sub> producido por el tratamiento testigo disminuyó gradualmente hasta los

12 días, después de lo cual aumentó en forma brusca, registrándose a partir de los 14 días, niveles comparables a los de semillas de menor edad (Figura 9a). Con el uso de AG<sub>3</sub> la producción de CO<sub>2</sub> alcanzó su punto más bajo a los 10 días, mientras que con CH, a los 8 días. Los niveles de CO<sub>2</sub> registrados posteriormente en estos 2 últimos tratamientos son inferiores a los obtenidos en las semillas que fueron únicamente inmersas en agua por 6 h (Figura 9b), con diferencias de hasta 1% de CO<sub>2</sub>.

## DISCUSION

### Efecto de la CH y el AG<sub>3</sub>

Este estudio muestra con claridad ( $\alpha > 0,05$ ) que dosis altas de CH (mayores de 0,1%) inhiben la germinación de las semillas de café.

Esto confirma los experimentos realizados previamente (Herrera *et al.*, 1989), con dosis superiores al 1% y corrobora el alto grado de sensibilidad de la semilla de esta especie a la CH.

Por el contrario, que dosis comprendidas entre 0,0075% y 0,01% sean estimuladoras de la germinación podría explicarse por el hecho de que durante la fase inicial de imbibición no existe una cantidad suficiente de oxígeno, por lo que la respiración es de tipo anaeróbica (Bewley y Black, 1982; Simon, 1984). Bajo estas condiciones, la actividad metabólica depende en gran parte de la activación inicial de las enzimas así como de la hidrólisis de las reservas (Mayer, 1977). La actividad mitocondrial es muy baja, mientras que las enzimas glicolíticas son funcionales desde el inicio de la imbibición. Se ha considerado que la CH activa la vía de las pentosas fosfato, lo cual permite un aumento del metabolismo inicial de la semilla (Amberger, 1986). Mayer (1977) considera que la vía de las pentosas fosfato compite por el sustrato respiratorio disponible, existiendo entonces una relación entre ambos. La evolución del CO<sub>2</sub> liberado (Figura 8) parece concordar con esta hipótesis, ya que en presencia de CH la liberación inicial es menor que en el testigo.

El hecho de que dosis muy bajas (0,005%) tengan un efecto aparentemente inhibitorio parece sugerir que esta concentración es insuficiente para poder estimular el metabolismo. Otro factor que puede contribuir con este hecho es la rápida metabolización de este producto (menos de 2 días) (Goldbach *et al.*, 1988), con lo cual dosis muy

bajas no sostendrían el metabolismo por el tiempo necesario para una acción efectiva del compuesto.

La interacción entre CH y AG<sub>3</sub> tiene un efecto estimulador en la germinación, con el cual se obtiene un 80% de plántulas 7 a 10 días más rápidamente que el testigo o con la AG<sub>3</sub> sola. A pesar de que el crecimiento se ve retardado por los inhibidores de la respiración (Côme, 1987), los resultados obtenidos sugieren que la combinación de ambas sustancias promueve el crecimiento y a la vez favorece una utilización más eficiente de las reservas energéticas. Resultados comparables fueron obtenidos por Herrera *et al.* (1990) en tubérculos de papa.

### **Función del agua**

La CH activa la rápida hidrólisis de las reservas de la semilla (Guevara y Herrera, 1989), sin embargo, en ausencia de una hidratación adecuada causaría un efecto detrimental, que puede llevar a la muerte del embrión (Villalobos *et al.*, 1991). Esto puede explicar que tiempos de imbibición de 15 y 20 min mejoren la capacidad germinativa de semillas tratadas con concentraciones altas de CH (0,05 y 0,1%). En presencia del pergamino, dosis de CH de 0,05% no presentaron el efecto inhibitorio observado en ausencia del mismo. Al respecto Simon (1984) observó en arveja que la remoción de la testa provocaba una fuerte entrada de agua en la semilla en los primeros estadios del período de imbibición, mientras que la presencia de la misma retarda considerablemente la entrada de líquido a la semilla, aún por varias horas. Ello refuerza la función del pergamino como una barrera a la penetración de sustancias y al intercambio gaseoso (Côme, 1975; Mayer, 1977).

En los ensayos en que se efectuó inmersión de la semilla en agua posterior al tratamiento, es probable que la disponibilidad de oxígeno se viera reducida. Esto puede deberse al acúmulo de etanol, lactato y etil-B-D-glucosa dentro de la semilla (Simon, 1984), los cuales afectan el metabolismo normal. En ausencia de pergamino, el flujo de agua y oxígeno hacia la semilla no tiene restricciones. El pergamino actuaría entonces como una barrera inicial a la entrada de oxígeno en forma libre, lo que bajo ciertas condiciones podría afectar la viabilidad de la semilla. Por otra parte, no puede descartarse que esta envoltura pueda también actuar como una barrera física a la emergencia de la radícula, como fue demostrado por Valio (1980).

El efecto negativo de la inmersión fue parcialmente reducido con niveles de 0,01% de CH (Figura 5), pues ésta activa la vía de las pentosas fosfato, que es funcional desde los momentos iniciales del proceso de germinación (Simon, 1984; Mayer, 1977). La presencia de CH permite a la semilla atravesar las fases de imbibición y respiración y alcanzar la fase de crecimiento, momento en que, con la perforación del pergamino, el flujo de oxígeno hacia la semilla es mayor (Mayer, 1977).

La total ausencia de germinación de la semilla con pergamino (con excepción de las semillas tratadas con CH) en el primer experimento podría explicarse a través de la hipótesis anterior, ya que las bandejas, al presentar una condición de alta humedad en forma continua, mantienen el pergamino saturado de agua y causan un déficit de oxígeno a la semilla, por lo que el metabolismo anaeróbico en la misma se prolonga, lo cual inhibe la germinación (Simon, 1984). De permanecer esta condición por varios días, se produciría la muerte de la semilla.

El efecto de la AG<sub>3</sub> sobre la inmersión es diferente. Bishnoi y Krishnamoorthy (1990) han observado que bajo condiciones de inmersión prolongada, la nodulación de la soya no es severamente afectada con la aplicación exógena de AG<sub>3</sub>, pues la nodulación misma aporta a la soya la dosis necesaria de este regulador, cuya síntesis endógena se ve inhibida bajo esas condiciones. En el caso del café es probable que el aporte exógeno cubra parcialmente las necesidades del embrión, lo que le permite desarrollarse normalmente hasta perforar el pergamino, con lo cual el suministro de oxígeno deja de ser limitante y se inicia el metabolismo normal de la plántula.

El uso combinado de CH y de AG<sub>3</sub> resulta en un efecto aditivo, que promueve una alta germinación como se observó en las Figuras 5a y 5b.

### **Efecto en la respiración**

La disminución del consumo de oxígeno en presencia de niveles altos de CH está relacionada con la activación de la respiración anaeróbica (Mayer, 1977). Este efecto puede observarse en los niveles de CO<sub>2</sub> producido durante los primeros días.

Las curvas de CO<sub>2</sub> obtenidas permiten caracterizar la germinación de la semilla de café en 3 fases:

a- Una primera fase que cubre aproximadamente los primeros 4 días, en donde se

- observa una fuerte liberación de CO<sub>2</sub>. Esta fase corresponde al proceso inicial de imbibición (Côme, 1983).
- b- La segunda fase va desde los 4 hasta los 10 días, en donde se produce una fuerte disminución de la liberación de CO<sub>2</sub> por parte de la semilla, con un punto mínimo entre los 8 y 10 días. Con base en observaciones visuales, esta fase corresponde a la germinación, que se caracteriza por ser un proceso endergónico (Bewley y Black, 1982; Carvalho y Nakagawa, 1983).
- c- La tercera fase se inicia entre los 10 y 12 días; a partir de aquí, el nivel de CO<sub>2</sub> producido por las semillas aumenta constantemente, como consecuencia del crecimiento propiamente dicho y ya no del proceso de germinación.

La inmersión inicial prolongada de la semilla (6 h) afectó considerablemente la germinación, con un atraso de 2 a 4 días, lo que evidenció que el factor limitante era la disponibilidad de oxígeno, como ha sido observado en otras semillas (Côme, 1983). La edad de la semilla afectó considerablemente este proceso, especialmente en la primera fase, en la que se observó una menor actividad inicial en las semillas más viejas. Esto puede atribuirse a una pérdida de vigor e indica una cierta degradación de la maquinaria enzimática de la semilla (Tissaoui, 1975; Vertucci, 1989) que sería responsable de que la germinación *sensu stricto* se retrase.

La evolución del CO<sub>2</sub> liberado por la semilla sometida a un período de inmersión prolongado, pero tratada con AG<sub>3</sub>, fue similar a la observada en el testigo. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Bishnoi y Krishnamoorthy (1990), ya que en este caso el AG<sub>3</sub> exógeno estimuló el proceso germinativo a pesar de que la inmersión por 6 h reduce el suministro de oxígeno.

Para dosis de CH inferiores a 0,5%, las semillas contenidas en frascos herméticamente sellados por más de 6 días presentaron una disminución de su germinación, mientras que con dosis de 0,5% esta disminución se observó desde los 2 días. Niveles altos de CO<sub>2</sub> (más de 4%) han sido considerados como inhibidores de la germinación (Bewley; Black, 1982). En las condiciones de este experimento este valor sólo se obtuvo con niveles de 0,5% de CH y en frascos sellados por 4 días (Figura 8). Conforme avanzó el

tiempo de exposición a este producto, aumentó el efecto inhibitorio en forma general y especialmente con dosis altas de CH, aunque no se volvieron a registrar valores de CO<sub>2</sub> tan altos. Esto puede indicar que semillas como el café resultan más sensibles a la presencia prolongada de cantidades importantes de CO<sub>2</sub>.

Las observaciones anteriores refuerzan la hipótesis de que la CH favorece la hidrólisis de las reservas de la semilla, aún sin haberse terminado el proceso de imbibición y germinación *sensu stricto*. Esta degradación de las reservas coincide con el menor peso seco de las plántulas (Herrera *et al.*, 1989) y sería responsable del mayor acúmulo de CO<sub>2</sub> en el frasco, cuando éste permanece sellado por varios días, favoreciendo la inhibición de la germinación.

No debe descartarse, sin embargo, la posibilidad de que parte del gas pueda haberse escapado de los frascos y que esa mejor germinación (observada a los 6 días) corresponda al momento en que el nivel de CO<sub>2</sub> dentro de los frascos disminuyera, permitiendo el inicio del proceso de germinación.

Los resultados obtenidos evidencian el efecto de la CH sobre el metabolismo de la semilla de café. La caracterización de los niveles de CO<sub>2</sub> permitió comprender mejor la acción de la CH sobre el proceso germinativo. Asimismo, se puso de manifiesto la importancia que tiene el pergamiño en el intercambio gaseoso y líquido de la semilla. Además, las respuestas obtenidas, indican que el suministro de agua a la semilla antes y después de un tratamiento químico tiene mucha importancia en la germinación de las mismas.

Este factor, no contemplado hasta el momento en el café, será objeto de un estudio más detallado, con el fin de comprender mejor los procesos de germinación en esta especie.

## RESUMEN

Se evaluó el efecto de la interacción entre períodos de inmersión y dosis de cianamida hidrogenada (CH) sola o en combinación con ácido giberélico (AG<sub>3</sub>), sobre la germinación de semillas de café. Concentraciones de CH de 0,075 y 0,001% (50% ia) estimularon la germinación de las semillas. El período de inmersión previo (entre 5 y 20 min) mostró un marcado efecto sobre la acción de la sustancia. El nivel de CO<sub>2</sub> en frascos

sellados por uno o más días se redujo gradualmente durante los primeros 8 días. Además, en presencia de CH la disminución de este gas en los frascos fue mayor. Los niveles de CO<sub>2</sub> aumentan después de 10 días. En el caso de semilla almacenada por 5 meses, se obtuvo los valores menores de CO<sub>2</sub> entre 10 y 12 días, que coinciden con el fin del proceso de germinación *sensu stricto*. La interacción de la CH con el AG<sub>3</sub> resultó estimuladora del proceso germinativo, especialmente cuando se usaron los períodos de inmersión más prolongados. Se discute el efecto de la CH y del agua en la germinación de la semilla de café, así como su interacción con el AG<sub>3</sub>.

### LITERATURA CITADA

- ALIZAGA, R.; GUEVARA, E.; HERRERA, J. 1990. Efecto de algunos tratamientos químicos sobre el período de reposo del maní (*Arachis hypogea*). *Agronomía Costarricense* 16(1): 29-36.
- AMBERGER, A. 1984. Uptake and metabolism of hydrogen cyanamide in plants. *In* Proceedings of bud dormancy in grapevines: potential and practical uses of hydrogen cyanamide on grapevines. Ed. by P.J. Weaver; J.O. Johnson and A.S. Wicke. U.C. Davis, University of California, pp. 5-10.
- BENDAÑA, F.E. 1962. The physiology of coffee seeds. II. Factors retarding germination, parchment. *Turrialba* 14:76-79.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. 1982. *Physiology and biochemistry of seeds*. 2ed. Berlin, Springer-Verlag, 2 v.
- BISHNOI N.R.; KRISHNAMOORTHY, H.N. 1990. Effect of waterlogging and giberellic acid on nodulation and nitrogen fixation on peanut. *Plant Physiol. and Biochem.* 28(5):663-666.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. 1983. Sementes; ciencia, tecnologia e produção. 2 ed., Campinas, Fundação Cargill. 429 p.
- CÔME, D. 1987. Germination et dormance des semences. *In* Développement des végétaux; aspects théoriques et synthétiques. Ed. by H. Le Guyader. Paris, Masson. pp. 103-118.
- CÔME, D. 1983. Germination. *In* Croissance et développement; physiologie végétale. II. Collection méthodes. Ed pour P. Mazlik. Paris, Hermann. pp. 129-226.
- CÔME, D. 1975. Rôle de l'eau, de l'oxigène et de la température dans la germination. *In* La germination des semences. Ed. by R. Chaussat; Y. Le Deunff. Paris, Gauthier-Villars. pp. 26-44.
- GOLDBACH, H.; THALER, Ch.; WUNSCH, A.; AMBERGER, A. 1988. Decomposition of 14C-labelled cyanamide in *Vitis vinifera* cuttings. *Journal Plant Physiology* 133:299-303.
- HERRERA, J.; ALIZAGA, R.; GUEVARA, E. 1990. Efecto de la cianamida hidrogenada y del ácido giberélico sobre el reposo de los tubérculos, el desarrollo y la producción de papa (*Solanum tuberosum*). *Agronomía Costarricense* 15(1-2):29-35.
- HERRERA, J.; GUEVARA, E.; BARBOZA, R. 1989. Efecto de la cianamida hidrogenada en la semilla de café (*Coffea arabica* L.) cv. Caturra. I. Influencia en la germinación. *Turrialba* 39(3): 287-292.
- MAYER, A. 1977. Metabolic control of germination. *In* The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. Ed. by A.A. Khan. Holland, Elsevier/North Holland Biomedical Press. p. 357- 384.
- OSEI-BONSU, K.; AMPOFO, S.T.; AMOAH, F.M. 1989. Coffee seed germination. II. Effect of some pretreatments on coffee (*Coffea canephora*) seed germination. *Café, Cacao, Thé* 23(4): 223-238.
- SIMON, E.W. 1984. Early events in germination. *In* Seed physiology. v.2. Germination and reserve mobilization. Ed. by M. David. pp. 77-115.
- SOLOMOS, T. 1977. Cyanide resistant respiration in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 28:279-297.
- TISSAOUI, T. 1975. Le métabolisme de la germination des semences. *In* La germination des semences. Ed. pour R. Chaussat; Y. Le Deunff. Paris. Gauthier-Villars. p. 65-80.
- VALIO, I.F.M. 1980. Inhibition of germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L. cv. Mundo Novo) by the endocarp. *Journal of Seed Technology* 5(1):32-39.
- VERTUCCI, C. 1989. The kinetics of seed imbibition: controlling factors and relevance to seedling vigor. *In* Seed moisture. Ed. by Ph.C. Stanwood, and M.B. McDonald, Madison, Wisconsin, Crop Science Society of America. 93-115.
- VILLALOBOS, R.; HERRERA, J.; GUEVARA, E. 1991. Germinación de semilla de pejobaye (*Bactris gassipaes*). II. Ruptura del reposo. *Agronomía Costarricense* 16(1): 69-76.