

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

Determinación de viabilidad y la relación entre imbibición y germinación de semillas de frijol, provenientes de un banco de germoplasma, almacenadas por 30 años

Joselin Piedra Chacón

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO
CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA

2022

Determinación de viabilidad y la relación entre imbibición y germinación de semillas de frijol, provenientes de un banco de germoplasma, almacenadas por 30 años

Joselin Piedra Chacón

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO
CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

2022

Determinación de viabilidad y la relación entre imbibición y germinación de semillas de frijol, provenientes de un banco de germoplasma, almacenadas por 30 años

Joselin Piedra Chacón

TESIS PARA OPTAR POR EL TITULO DE PROFESIONAL DE INGENIERO
AGRÓNOMO CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA



Luis Orlando Barboza Barquero, Dr.

DIRECTOR DE TESIS



Andrés Antonio Monge Vargas, Dr.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL




Néstor Felipe Chaves Barrantes, Dr.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



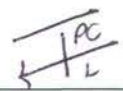
William Alberto Solano Sánchez, MSc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Luis Enrique Gómez Alpízar, Dr.

DIRECTOR DE LA ESCUELA



Joselin Piedra Chacón, Bach.

SUSTENTANTE

DEDICATORIA

A mi madre y mi padre, quienes con su amor, paciencia y ejemplo han inspirado en mí el crecimiento personal. A mi hermano por siempre ser incondicional. A mi sobrino quien con su llegada me ha llenado de felicidad. A ellos que de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas. Les dedico este logro, el cual pertenece tanto a mí como ellos.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco al profesor Luis Barboza Barquero, el cual como director de tesis me guió con paciencia y sabiduría en este proceso. Le agradezco a mis lectores de tesis Andrés Monge Vargas, Néstor Chaves Barrantes y William Solano Sánchez, también a las profesoras Ester Vargas Ramírez y María Viñas Meneses por sus aportes y apoyo. A Raquel Chacón Bonilla y Delmy Castillo Crisóstomo por su colaboración y grata compañía. A la Vicerrectoría de Investigación por la beca otorgada. Al Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC) y a Reinaldo Reyes Pereira por todo el apoyo y conocimientos brindados. Al Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) y el personal que lo conforma, los cuales siempre me hicieron sentir como en casa. Al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y al Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) por su colaboración, la cual permitió llevar a cabo la tesis.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	ii
1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Objetivos	4
3.1 Objetivo General	4
3.2 Objetivos Específicos.....	4
4. Revisión de literatura	5
4.1 Viabilidad de la semilla.....	5
4.2 Pruebas para comprobar la viabilidad de la semilla.....	6
4.3 Imbibición	6
4.4 Uso de imágenes	8
5. Metodología	9
5.1 Localización y material vegetal	9
5.2 Evaluación de la viabilidad en un set de accesiones del banco de germoplasma del CIAT	10
5.3 Caracterización de las accesiones	10
5.4 Prueba de imbibición.....	10
5.5 Prueba de germinación.....	11
5.6 Porcentaje de humedad	11
5.7 Determinación de actividad de agua (AW).....	12
5.8 Color y dimensiones de las semillas	12
5.9 Análisis de microscopía electrónica de barrido	12
5.10 Aislamiento de hongos a partir de granos de frijol	13
5.11 Identificación de especies de hongos	13

5.12 Análisis estadísticos	14
6. Resultados	15
6.1 Propiedades de las distintas accesiones.....	15
6.2 Optimización de las condiciones para las pruebas de germinación	19
6.3 Viabilidad de las accesiones del CIAT	20
6.4 Correlaciones entre propiedades y viabilidad de las semillas	26
6.5 Microscopía electrónica en accesiones con baja y alta imbibición.....	28
6.6 Presencia de hongos observados en las accesiones.....	30
6.7 Comparación del análisis de semillas de manera individual y muestral	32
7. Discusión	35
7.1 Determinación de la viabilidad de 300 accesiones de frijol.....	35
7.2 Relación entre semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L) y su proceso de imbibición	37
7.3 Correlaciones entre propiedades evaluadas	38
7.4 Microfisuras en semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L).....	39
7.5 Hongos observados en semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L).....	40
7.6 Análisis individual y análisis muestral de la semilla	40
8. Conclusiones	42
9. Literatura citada	43
10. Anexos	49

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa del sitio de recolección de las accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris*) del CIAT. 9
- Figura 2.** A. Actividad de agua (*Aw*), B. Humedad (%), C. Clorofila (pA) y D. Área (cm²) evaluados en 300 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE. Se muestra el promedio (ordenado de menor a mayor fenotipo) y las barras de error (color rojo) representan el error estándar (SE). 16
- Figura 3.** Representación 3D de los colores rojo (R), verde (G por el inglés “Green”), azul (B, por el inglés “Blue”) determinados en 300 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE. 17
- Figura 4.** Set demostrativo (40 accesiones) de la diversidad de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provenientes del banco de germoplasma del CIAT y almacenadas por 30 años en el CATIE, junto con las variedades Cabécar (Rojo) y Brunca (Negro) de Costa Rica. Las semillas proceden de diversos países (CR= Costa Rica, MEX= México, GTM= Guatemala, HND= Honduras, NIC= Nicaragua, ECU= Ecuador, PER= Perú, ARG= Argentina, BRA= Brasil, ESP= España, TUR= Turquía, SYR= Siria, IRN= Irán, UGA= Uganda, TZA= Tanzania, ZMB= Zambia). 18
- Figura 5.** Porcentaje de semillas germinadas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). El primer conteo fue evaluado a los siete días después de la siembra. El segundo conteo fue evaluado 14 días después de la siembra. Las bandejas se colocaron en distintos estratos del estante. Se muestra el promedio y las barras de error representan el error estándar (SE). 19
- Figura 6.** Porcentaje de semillas germinadas (plántulas normales) en el primer conteo, evaluado a los 7 días después de la siembra, en 300 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE. Se muestra el promedio (ordenado de menor a mayor porcentaje de germinación) y las barras de error (color rojo) representan el error estándar (SE). 20
- Figura 7.** Porcentaje de semillas germinadas (plántulas normales) de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en el segundo conteo, evaluado a los 14 días después de la siembra, en 300 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE. Se muestra el promedio (ordenado

de menor a mayor porcentaje de semillas germinadas) y las barras de error (color rojo) representan el error estándar (SE).....	21
Figura 8. A y B. Plántulas (normal) germinadas a partir de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) proveniente del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE.....	22
Figura 9. A y B. Plántulas (anormal) germinadas a partir de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE.....	22
Figura 10. Porcentaje de plántulas anormales de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) en 300 accesiones de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE, evaluado 14 días después de la siembra. Se muestra el promedio (ordenado de menor a mayor porcentaje de plántulas anormales) y las barras de error (color rojo) representan el error estándar (SE).....	23
Figura 11. Porcentaje de semillas muertas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) en 300 accesiones de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE, evaluado 14 días después de la siembra. Se muestra el promedio (ordenado de menor a mayor porcentaje de semillas muertas) y las barras de error (color rojo) representan el error estándar (SE).....	24
Figura 12. Imbibición de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) en 300 accesiones de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE, evaluado a las 17 horas de imbibición. Se muestra el promedio (ordenado de menor a mayor imbibición) y las barras de error (color rojo) representan el error estándar (SE).....	25
Figura 13. Razón de crecimiento del área de las semillas a través del tiempo (17 horas) en 300 accesiones. A. curva de imbibición promedio de 300 accesiones. B. curva de imbibición con el modelo de Gompertz. C. curva de imbibición de valor mínimo con el modelo de Gompertz. D. curva de imbibición con el valor máximo con el modelo Gompertz.	26
Figura 14. Red de correlaciones (método Spearman) para distintas variables evaluadas en semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) que representan el fenotipo de 300 accesiones de frijol provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE. Las líneas de color verde representan una correlación positiva. Las	

líneas de color rojo representan una correlación negativa. El grosor de la línea representa el grado de significancia. Se muestran los valores para las correlaciones significativas a un valor de $P \leq 0,05$	27
Figura 15. Relación creciente entre la actividad de agua (A_w) y el contenido de humedad (%), determinadas en semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>). Evaluado en 300 accesiones (Acc). La línea azul indica la regresión lineal, mientras que la franja gris es el intervalo de confianza.	28
Figura 16. A. Imagen lateral de una semilla de frijol G11811 (<i>Phaseolus vulgaris</i>). B, C, D. Imágenes de microscopia electrónica de barrido de las estructuras de una semilla de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) a diferentes distancias de enfoque. Se señalan las siguientes estructuras: L = Lente, H = Hilo, M = Micrópilo.	29
Figura 17. Imágenes de microscopia electrónica de barrido en semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) que presenta imbibición (baja y alta) sin y con presencia de microfisuras. Las microfisuras se observan en la estructura de la lente del frijol.	30
Figura 18. Imágenes de microscopia electrónica de barrido en dos accesiones (G12041 y G11819) de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) que presentas hifas. En la imagen se observa la estructura de la lente del frijol.	31
Figura 19. Caja Petri con micelio presente en dos accesiones (G12041 y G11819) de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	31
Figura 20. Bandas de ADN obtenido del micelio de dos accesiones (G12041 y G11819) de semillas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>). Se muestra un marcador del peso molecular (PM) y un control negativo (C-). Las bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 y 11 corresponden a la accesión G12041. Las bandas 7, 8 y 12 corresponden a la accesión G11819.	32

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Correlaciones (método Spearman) muestrales e individuales para distintas variables evaluadas en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y su proceso de germinación. Los datos representan el fenotipo de en 300 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE. Los datos en rojo representan las principales correlaciones. Se muestran los valores para las correlaciones significativas a un valor de $P \leq 0,05$ 34

1. Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar la viabilidad y la existencia de una relación entre la imbibición y la germinación de semillas de frijol pertenecientes al banco de germoplasma del CIAT, almacenadas en una cámara fría (-20 °C) por un periodo de 30 años en el CATIE. Por ello se evaluaron 300 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris* L). En las semillas de estas accesiones se realizaron pruebas de actividad de agua (Aw), humedad (%), clorofila (pA) y área (cm²), germinación (% de plántulas normales), anormales (% de plántulas anormales), muertas (%) e imbibición (A₀/A₁).

Mediante pruebas preliminares con genotipos de color rojo (Cabécar) y negro (Brunca) se homogenizaron las condiciones de germinación. Una vez establecidas éstas, se realizaron las pruebas de germinación con todas las accesiones del CIAT, donde se observó una pérdida en el vigor de éstas, sin embargo, la conservación de la semilla fue adecuada, ya que actualmente un 73% de las accesiones presenta una germinación mayor al 85%.

Entre la prueba de imbibición y la prueba de germinación no se observó correlación alguna (0,01). Se observaron correlaciones importantes entre la imbibición y el área de la semilla (-0,36); primer conteo de germinación y área (-0,46); y entre actividad de agua y contenido de humedad (0,89); los colores G-R (0,96) y G-B (0,82). Entre la actividad de agua y el contenido de humedad se encontró una relación creciente. Por lo cual la prueba del contenido de humedad se podría sustituir por el método de actividad de agua (Aw), al presentar ventajas cuando se implementa. Se realizaron pruebas de microscopía electrónica de barrido en semillas de alta (mayor a 1,7) y baja (menor a 1,5) imbibición. En ambas semillas (baja y alta) se observó la presencia, así como ausencia de microfisuras. Las semillas de alta imbibición presentaron microfisuras de mayor longitud que las accesiones de baja imbibición, 496 µm (±122,01) y 239 µm (±65,92) respectivamente. Durante estas pruebas también se observó la presencia de hifas. Los géneros de hongos identificados fueron: *Rhizopus arrhizus*, *Aspergillus flavus*, *Syncephalastrum racemosum* y *Aspergillus clavatus*. Al realizar el análisis individual de la semilla se encontraron resultados similares al análisis muestral, sin embargo, cabe recalcar que el tamaño de la muestra utilizada fue del 5% respecto a la indicada por ISTA (2016).

2. Introducción

Los bancos de germoplasma se encargan de almacenar recursos fitogenéticos. Estos son utilizados para mantener la diversidad genética y un acervo de genes para realizar el mejoramiento de los cultivos (Sánchez y Jiménez, 2010). Las semillas que resguardan los bancos de germoplasma son una valiosa herramienta para brindar opciones de mejora en la agricultura, más si se considera que el planeta está afronta diversas vicisitudes como el cambio climático, pandemias, guerras, hambruna y pobreza, entre otras; por lo tanto, la conservación de recursos genéticos es fundamental para ofrecer oportunidades de mejora en el futuro (FAO, 2014).

Los bancos de germoplasma deben almacenar las semillas bajo las condiciones favorables para cada especie y también son responsables de realizar la renovación de los materiales, ya que la viabilidad de la semilla disminuye conforme esta envejece (Rao et al., 2007). Existen diversos métodos para evaluar la viabilidad de las semillas; por ejemplo, la evaluación del porcentaje de semillas germinadas mediante pruebas de germinación, las cuales se basan en conteos de plántulas normales después de varios días de imbibición. Sin embargo, estas pueden tardar hasta dos semanas y la cantidad de información que brindan es limitada (Rodríguez et al., 2008). Con esto se hace necesario buscar nuevos métodos que sean más eficientes en tiempo e información.

En la actualidad, existen métodos modernos para evaluar la viabilidad de las semillas, por ejemplo, el uso de imágenes digitales. En un estudio en que se compararon pruebas de germinación e imbibición con el uso de imágenes digitales en semillas de maíz, se obtuvo una correlación significativamente positiva (r de Pearson = 0,70) entre ambas metodologías (Miller et al., 2018), lo cual indicó que la prueba de imbibición puede ser un método eficaz para los investigadores; sin embargo, debe ser estudiado en otras especies para confirmar el resultado obtenido en maíz. La prueba de imbibición sería una herramienta valiosa para evaluar la viabilidad de accesiones de semillas en bancos de germoplasma, por la sencillez y velocidad del proceso, también, cuenta con la ventaja de permitir el estudio individual de cada semilla (Bradford, 2018), en vez de utilizar muestras compuestas por varias semillas.

El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) ubicado en Cali, Colombia, es una institución de investigación agrícola, que cuenta con un banco de germoplasma donde se conservan las colecciones más grandes y diversas del mundo de frijol (37.938), yuca (6.155) y forrajes tropicales (22.694) (Cuervo et al., 2020). Por conflictos políticos que surgieron en Colombia para finales de los años 80 e inicios de los 90, el CIAT envió 19 091 accesiones de su colección mundial de frijol a Costa Rica, específicamente al Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) en Turrialba, con el fin salvaguardar esa diversidad genética. Han pasado más de 30 años y dicha colección se logró rejuvenecer y respaldar en otros lugares, por lo que el material original conservado en CATIE está disponible para realizar pruebas con el fin de evaluar su viabilidad.

El Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica, cuenta con experiencia en pruebas de germinación e imbibición con el uso de imágenes digitales para evaluar la viabilidad de las semillas (Valerio et al., 2020). Esta metodología de análisis es novedosa y permitiría evaluar en corto tiempo la viabilidad de las semillas del banco de germoplasma de frijol del CIAT-CATIE. Por esto, esta investigación tuvo como objetivo principal, determinar la viabilidad y la existencia de una relación entre la imbibición y la germinación de las semillas de frijol pertenecientes al banco de germoplasma del CIAT, almacenadas en el CATIE durante 30 años.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Determinar la viabilidad y la existencia de una relación entre la imbibición y la germinación de semillas de frijol pertenecientes al banco de germoplasma del CIAT, almacenadas en una cámara fría (-20 °C) por un periodo de 30 años.

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la viabilidad de 300 accesiones de frijol pertenecientes al banco de germoplasma del CIAT, almacenadas en una cámara fría por un periodo de 30 años para identificar accesiones con alta capacidad de almacenamiento.
2. Relacionar la imbibición de agua de las semillas de *Phaseolus vulgaris* L. y su germinación para valorar si es posible cuantificar la viabilidad de forma rápida y eficaz.
3. Analizar si el estudio individual de cada semilla de frijol permite disminuir el tamaño de la muestra que es utilizada en una prueba de germinación.

4. Revisión de literatura

4.1 Viabilidad de la semilla

En las últimas décadas las colecciones de los bancos de germoplasma han aumentado considerablemente (Franco, 2008), asimismo incrementa la necesidad de contar con nuevas tecnologías que ayuden al manejo y conservación del germoplasma, que permitan disminuir el costo económico de mantenimiento y el tiempo de respuesta de las pruebas. La viabilidad de la semilla se define como la capacidad que esta posee para germinar, se ve influenciada por factores como el tipo de semilla, su fisiología, el tiempo y las condiciones de almacenamiento (Doria, 2010). El monitoreo de la viabilidad de las semillas almacenadas en los bancos permite determinar si una semilla debe preservar o debe ser descartada (Cárdenas et al., 2004). Este proceso se realiza antes del almacenamiento y después se continúa la evaluación cada cierto tiempo (5-20 años), ya que proporciona información para realizar el descarte de semillas inviables y hacer un uso más eficiente de los recursos económico y humano (Engels y Visser, 2007); además, ayuda en la identificación de las necesidades de propagar nuevamente un material determinado.

La viabilidad de las semillas no se pierde de manera repentina, esta disminuye progresivamente con el paso de los años, pues éstas pueden presentar cambios fisiológicos o envejecimiento asociado a su clase (Rao et al., 2007). El almacenamiento de las semillas no siempre se realiza en un ambiente controlado, por lo tanto, en aquellos casos en que no se tiene control de la temperatura y humedad, la viabilidad de la semilla estará influenciada por las condiciones climatológicas de la región. En Brasil los bancos de germoplasma manejan una temperatura que oscila alrededor de -20°C , con humedad entre 5 % y 7 %, donde los recursos se almacenan en envases impermeables herméticamente cerrados (Sánchez et al., 2011.) El almacenamiento de las semillas en un ambiente frío con bajo contenido de humedad es un procedimiento muy utilizado, y puede aumentar la longevidad de muchas especies de semillas (Hartmann y Kester, 1992).

4.2 Pruebas para comprobar la viabilidad de la semilla

Dos pruebas utilizadas para comprobar la viabilidad de las semillas son el análisis estándar de germinación y la prueba topográfica de tetrazolio (Rodríguez et al., 2008). La primera consiste en colocar las semillas sobre algún sustrato en las condiciones óptimas de incubación para cada especie y posteriormente, en un tiempo estandarizado las semillas se revisan para realizar un conteo de la germinación. Sin embargo, el principal problema de esta prueba es el tiempo; este tipo de ensayos suelen durar varios días, ya que se debe esperar a que la semilla germine.

La segunda prueba de tetrazolio, consiste en la tinción de las células vivas del embrión y los tejidos de la semilla, las células vivas poseen enzimas llamadas deshidrogenasas que reaccionan con la sal de tetrazolio, que al reducirla forman un nuevo compuesto de coloración roja denominado trifenil formazan (Ruiz, 2009). Esta prueba presenta la ventaja que requiere poco tiempo de ensayo, pues los resultados se pueden obtener en menos de 24 horas, además, se encuentra aprobada en muchas especies; sin embargo, el ensayo requiere que sea realizado por una persona calificada, existe subjetividad en la interpretación de los resultados y el procedimiento no está recomendado en semillas de tamaño pequeño como algunas especies hortícolas (Rodríguez et al., 2008).

Otro método que se utiliza para determinar la viabilidad de la semilla (desde un punto de integridad física) es la radiografía con rayos x, la cual es rápida y no destructiva, no obstante, presenta el inconveniente de requerir un equipo costoso (García y Villamil, 2001).

4.3 Imbibición

Para que se lleve a cabo la germinación de la semilla, es necesario que se cumplan varios procesos, uno de estos es la absorción de agua por parte de la semilla o imbibición, el cual sucede por las diferencias del potencial hídrico entre la semilla y la solución de

imbibición (Suárez y Melgarejo, 2010). Diversos factores pueden influenciar esta fase, Vertucci y Leopold (1983) mencionaron algunos como las bajas temperaturas y la baja humedad inicial, ya que ambas condiciones disminuyen la imbibición, al retrasar la tasa de absorción del agua.

Cuando una semilla viable cuenta con todas las condiciones idóneas para la germinación, pero no lleva a cabo el proceso, se hace referencia a que se encuentra en estado de dormancia. Existen diversos tipos de dormancia, uno de estos es la impermeabilidad de la cubierta seminal (Varela y Arana, 2011). La testa tiene como función proteger al embrión; sin embargo, puede retrasar el proceso germinativo, al disminuir la capacidad de absorción y retención de agua, lo que entorpece el transporte a otros tejidos; como lo demostraron Moreno et al., (2006), en un ensayo con semillas de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.),

Soltani et al., (2021), mediante el uso de microscopía electrónica de barrido, determinaron que las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de rápida absorción poseen varias microgrietas a lo largo de la superficie del rafe, las cuales también estaban presentes en la superficie del rafe de genotipos de frijol que no presentaron dormancia.

Pérez y Acosta (2002), obtuvieron resultados en semillas de frijol muy similares a los de Moreno et al. (2006) en su estudio “Efecto de la testa sobre la germinación de semillas de caucho (*H. brasiliensis*)”, donde explican como la testa es una estructura que dificulta el paso del agua y retrasa el proceso de imbibición, y evidenciaron que la escarificación de la semilla acelera la absorción del agua en las primeras etapas. También, demostraron la importancia del micrópilo e hilo en el proceso de absorción de agua, ya que, al sellarlo se redujo drásticamente la absorción, por lo que señalan a esta estructura como la principal responsable del proceso de absorción de agua en las primeras fases de la imbibición. Sin embargo, recalcan que estas dos estructuras participan de forma diferente en la imbibición dependiendo del genotipo de la semilla ya que, la testa presentó distintos grados de permeabilidad en los genotipos estudiados.

4.4 Uso de imágenes

Actualmente, existen métodos modernos, basados en el análisis de imágenes, para caracterizar a las semillas y su viabilidad. Joosen et al. (2010) y Wagner et al. (2011) realizaron trabajos en los cuales mediante el análisis de imágenes monitorearon el proceso de germinación de forma automatizada de las semillas de *Arabidopsis thaliana*, *Brassica spp*, *Brassica napus*, *Medicago truncatula*, *Lycopersicum esculentum*, *Brassica rapa*, *Medicago sativa*, *Helianthus annuus*, *Allium cepa*; y *Zea mays*. Miller et al. (2018) efectuaron pruebas de imbibición y germinación en semillas de maíz, en donde por medio de análisis de imágenes estudiaron la relación que existe entre ambos procesos. Al concluir la investigación encontraron una correlación positiva entre la germinación y la imbibición. Se toma en cuenta que las pruebas tradicionales para evaluar el potencial de germinación de una semilla tardan varias semanas, la prueba de imbibición sería más rápida ya que, se pueden obtener resultados en cuestión de horas. También indican que los fitomejoradores podrían usar esta técnica para seleccionar las características de germinación de una semilla, así como evaluar la calidad de estas.

En un estudio se determinó la velocidad a la cual el frijol Matambú (*P. vulgaris*) se expande durante el proceso de imbibición por medio de imágenes digitales. Para llevar a cabo la investigación se utilizó un sistema de procesamiento de imágenes automatizado, con el cual se determinó la dimensión de los frijoles. Al finalizar la investigación, se recomendó este tipo de análisis como una herramienta de utilidad al eliminar el sesgo producido por el operador, ser de bajo costo y reducir el tiempo de operación (Valerio et al., 2020).

En el trabajo realizado por Gómez (2018), se presentó el diseño de un prototipo para la obtención de imágenes digitales, el cual de forma automática puede registrar el proceso de germinación en semillas de frijol. El prototipo estaba compuesto por una cámara digital y un sistema de movimiento para la toma de las imágenes de manera independiente, las cuales se procesaron en un software de acceso libre. Se utilizaron tres

genotipos de frijol (Nambí, Cabécar y Brunca), sobre los que se midió la expansión del área de las semillas durante la imbibición y se realizaron pruebas de germinación convencionales. Al finalizar la investigación se observó cómo los genotipos que absorbieron mayor cantidad de agua tuvieron mayores porcentajes de germinación, lo que sugiere que podría existir una relación entre ambos procesos. Sin embargo, el autor recomendó para futuros ensayos, aumentar el número de genotipos para verificar el resultado.

5. Metodología

5.1 Localización y material vegetal

La investigación se llevó a cabo en el CIGRAS de la Universidad de Costa Rica, ubicado en la Ciudad de la Investigación de la sede Rodrigo Facio, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica, durante el año 2021. Se evaluaron 300 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) pertenecientes al banco de germoplasma del CIAT y almacenadas en el CATIE (Figura 1). Todas las accesiones están identificadas como G#, donde numeral hace referencia al número de accesión (ejemplo G675).

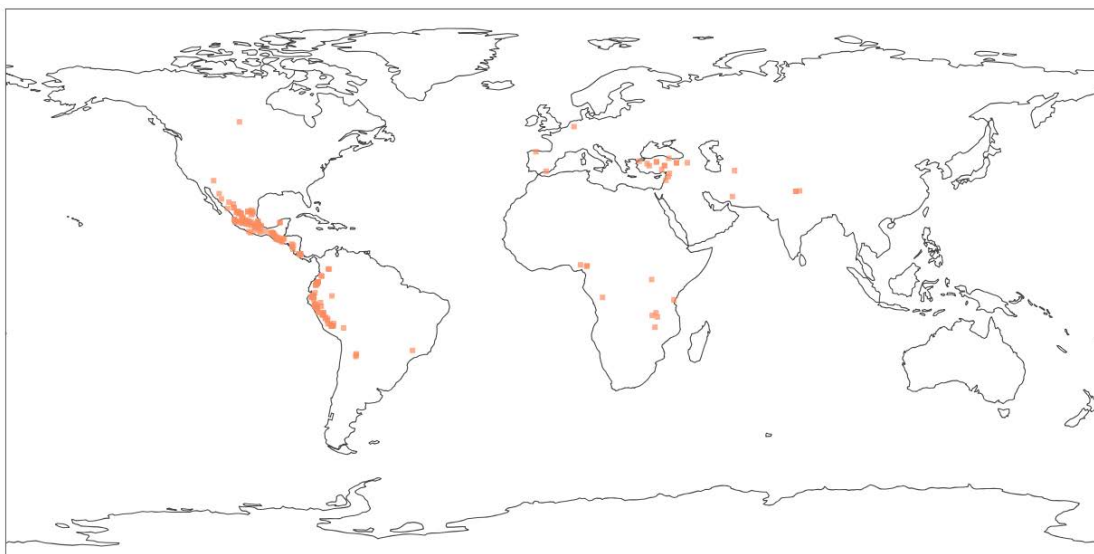


Figura 1. Mapa del sitio de recolección de las accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris*) del CIAT.

5.2 Evaluación de la viabilidad en un set de accesiones del banco de germoplasma del CIAT

Se trabajó con 300 accesiones de *P. vulgaris*. Las accesiones se recibieron del CATIE y se almacenaron en el CIGRAS de la Universidad de Costa Rica a una temperatura de 8 °C hasta el inicio de las pruebas. El material evaluado estuvo almacenado en el banco de semillas del CATIE por 30 años.

5.3 Caracterización de las accesiones

Para la caracterización de las accesiones se realizó un registro con la siguiente información: tipo de empaque, integridad del empaque, estado íntegro de la muestra, número de semillas y país de origen.

5.4 Prueba de imbibición

La prueba de imbibición se llevó a cabo en un papel de germinación azul (15,4 x 23 cm) y, se colocaron 10 semillas por accesión, previamente escarificadas. El papel junto con las semillas se colocó sobre un molde acrílico que contenía 900 ml de agua destilada, con el fin de mantener la humedad relativa (Anexo 1). Se tomaron fotografías cada 15 minutos por 17 horas; la cámara fotográfica se controló por medio del RaspberryPi (Raspberry Pi HD 5 megapíxeles). Se tuvo un control de la temperatura y la humedad relativa con un registrador de datos (Hobo MX2301). Se evaluó el incremento en el área (cm²) de cada semilla con respecto al área inicial, por medio de imágenes digitales. El experimento se realizó por duplicado de forma simultánea.

5.5 Prueba de germinación

Para la prueba de germinación, se sembraron en turba (“peat moss”) 10 semillas por accesión, provenientes de la prueba de imbibición, a una profundidad de 2,5 cm en bandejas de plástico de 50 celdas individuales (5,0 x 28,0 x 54,0 cm). Se dio trazabilidad a cada semilla en la bandeja (cada semilla tuvo la misma posición durante las pruebas de imbibición y germinación) para mantener el dato individual de la imbibición y compararlo con el de la germinación. Se utilizaron únicamente 10 semillas, ya que se contó con poca disponibilidad de estas. Las bandejas fueron llevadas a un estante (Anexo 2) dentro de un invernadero a una temperatura promedio de 24 - 25 °C. Este estante se construyó con las mismas medidas de los que se utilizan en el CIAT (90 x 55 x 195 cm). La evaluación de la germinación fue realizada con los lineamientos establecidos por la Asociación Internacional de Análisis de Semillas (ISTA, por sus singlas en inglés) (ISTA, 2021) (Anexo 3).

A los siete días se realizó el primer conteo de germinación, evaluando plántulas normales y a los 14 días se realizó el conteo final de germinación, en donde se evaluó las plántulas normales y anormales (Anexo 4), semillas no germinadas y muertas (Anexo 5). Adicionalmente, para determinar la viabilidad de las semillas no germinadas, se realizó la prueba de tetrazolio (TZ) al 1 % (Anexo 6), la cual requirió un periodo de incubación de dos horas a 30 °C en oscuridad (Peters, 2005). Posterior a este proceso, la semilla fue lavada con agua destilada y se evaluó individualmente cada una. La temperatura y la humedad relativa fueron monitoreadas por medio de un registrador de datos (Hobo MX2301). El experimento se realizó por duplicado de forma simultánea.

5.6 Porcentaje de humedad

El contenido de humedad se evaluó con el método gravimétrico. Para determinar el porcentaje de humedad se molieron 10 semillas por accesión, lo obtenido de este proceso se distribuyó en tres frascos metálicos (tres repeticiones). Seguidamente, en una

balanza analítica, se realizó el peso fresco, luego las muestras fueron secadas a 130 °C por 2 horas. Al concluir, las muestras se colocaron en un desecador por 30 minutos, para posteriormente medir su peso seco.

5.7 Determinación de actividad de agua (AW)

Para medir la actividad de agua, 10 semillas se colocaron en el equipo Rotronic HP23-AW-A a 25 °C. La medición se hizo por duplicado de forma simultánea y con la misma cantidad de semillas.

5.8 Color y dimensiones de las semillas

El color y las dimensiones de las semillas se observaron por medio de imágenes digitales, para lo cual se utilizaron 10 semillas por accesión. Para determinar el color se utilizó el plugin “Color inspector 3D” del software imageJ Fiji (Schindelin et al., 2012), el color se verificó con un tablero de colores conocidos. Para determinar las dimensiones se tomaron imágenes con una cámara Nikon y se procedió a segmentar y hacer un análisis de partículas con el software imageJ Fiji (Schindelin et al., 2012).

5.9 Análisis de microscopía electrónica de barrido

Los análisis se realizaron en el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC) en San José, Costa Rica. Se trabajó con 14 accesiones (siete de alta imbibición y siete de baja imbibición) que se cubrieron con una capa de 200 nm de oro sin fijar ni procesar y luego se colocaron en el microscopio electrónico JEOL modelo JSM 6390LV (Tokio, Japón).

5.10 Aislamiento de hongos a partir de semilla de frijol

Se colocaron cuatro semillas de frijol en un beaker y se les realizaron tres lavados con agua destilada autoclavada hasta cubrir la muestra. Seguidamente se colocaron las semillas en una placa con medio agar-malta. Las placas se incubaron a 30 °C por 7 días. Posteriormente se colocó una pequeña sección del micelio en medio CYA25 en el centro de la placa. Estas placas se llevaron a una incubadora a 30°C por 7 días. Se tomaron discos del micelio y se colocaron en un tubo eppendorf con agua destilada. Se colocaron 10 µl de la solución en una cámara de conteo Neubauer para contar y calcular la concentración de esporas, la muestra se diluyó de manera que al final se obtuvo una concentración de 30 esporas en 50 µl (30 esporas por placa de Petri). De la dilución se tomaron 50 µl y se colocaron en el centro de una placa con medio agar-malta (2 placas por muestra), se incubó por un 1 día a 30°C luego se tomaron las microcolonias y se colocaron en medio CYA25 en el centro de la placa por 7 días. Posteriormente se prepararon 2 tubos eppendorf por placa con 3 ml de glicerol al 10%, a estos tubos se agregaron 8 discos extraídos con una pajilla de la zona media de cada colonia y se almacenaron a -80°C.

5.11 Identificación de especies de hongos

Se congeló el micelio fresco por 1 hora a -20 °C y liofilizó por 3 días. Se tomaron 20 mg de micelio seco en tubos Eppendorf de 2 mL y se molieron. Se agregó 1 mL buffer CTAB + 2µL Mercaptoethanol + 1µL Proteasa (Quiagen) y se incubó 10 min a 42°C y después 10 min a 65°C. Se agregó 0,8 mL cloroformo/isoamylalcohol (24:1) y se incubó en frío (-20°C) por 10 minutos, luego se centrifugo 10 min a 8000 rpm.

Se transfirieron 700 µL de la fase de arriba a un nuevo tubo Eppendorf y se colocó 1 volumen de isopropanol, el tubo Eppendorf se incubó 20 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó 15 minutos y se descartó el sobrenadante; con 500 µL 70% etanol se lavó el precipitado. Después de secar el precipitado se agregó 50-100 µL buffer TE-light y se incubó a 42°C durante 30 min.

Para la amplificación de ADN se hizo un Mastermix, para este se utilizó: 9,5 μL de H_2O ; 1,50 de 10x Buffer Taq DNA; 1,50 de dNTP (mM); 0,60 μL imprimador forward (10 μM); 0,60 μL imprimador reverse (10 μM) y 0,35 de Taq DNA Polimerasa (5 U/ μl). Se agregó 1 μL ADN por muestra. Se trabajaron 12 muestras y un control negativo (C-). Luego se realizó el PCR con un perfil de inicio de 3 minutos a 95°C. Desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, alineamiento a 60°C durante 30 segundos, extensión a 72°C con 30 ciclos. Una extensión final de 72°C durante 5 minutos.

Luego se cargó en el gel de agarosa (2%) 4 μL de muestra + 2 μL de la mezcla GelRed y loading dye (98,5 μL de LD y 1,5 μL de Gelred), se corrió a 100V por 1 hora. Por último, se realizó la identificación mediante secuenciación utilizando el método Sanger. Este proceso se llevó a cabo en la empresa Macrogen, Inc. ubicada en Corea del Sur.

5.12 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron registrados en hojas de cálculo. Se utilizó un diseño irrestricto al azar. Los análisis de datos se realizaron por medio del lenguaje de programación R (interpreta el punto como coma decimal). Para las variables de actividad de agua (A_w), humedad (%), clorofila (pA) y área (cm^2), germinación, anormales, muertas e imbibición, se calculó el promedio y el error estándar. Se graficó con el paquete de R ggplot2 (H. Wickham, 2016).

Se utilizaron datos relativos al área inicial según lo indicado por Gómez (2018), para obtener una razón de crecimiento de las semillas producto del proceso de imbibición. Se obtuvo la velocidad de la imbibición por medio del parámetro k. También se obtuvo la imbibición máxima y el tiempo para llegar al punto de inflexión máxima. Con los datos obtenidos se usó un modelo matemático sigmoide para describir la cinética de imbibición de las semillas mediante el paquete de R “easylnls” (E. Arnhold, 2017).

Se estimaron coeficientes de correlación de Spearman en las variables de actividad de agua (A_w), contenido de humedad (CH), colores R-G-B, conteo a los 7 días después de la siembra (primer conteo), segundo conteo, semillas muertas, plántulas anormales, área de la semilla e imbibición (Figura 14). Se realizó un modelo lineal entre la actividad de agua (A_w) y el contenido de humedad (%). Para analizar el uso de semilla individual contra los datos de una muestra poblacional, se compararon los valores de las correlaciones (método Spearman) obtenidas.

6. Resultados

6.1 Propiedades de las distintas accesiones

Se observó una amplia variabilidad entre las accesiones analizadas para actividad de agua (A_w), humedad (%), clorofila (pA) y área (cm^2). Los valores de actividad de agua (A_w) variaron entre 0,34 (G726) y 0,63 (G15806) (Figura 2A). Los resultados de humedad presentaron un rango entre 6,67% (G603) y 16,68% (G14815) (Figura 2B). Con respecto a los valores de clorofila, estos estuvieron entre 419,5 pA (G13935) y 3325 pA (G14515) (Figura 2C). El área de las accesiones varió entre 0,43 cm^2 (G4459) y 1,42 cm^2 (G11806) (Figura 2D).

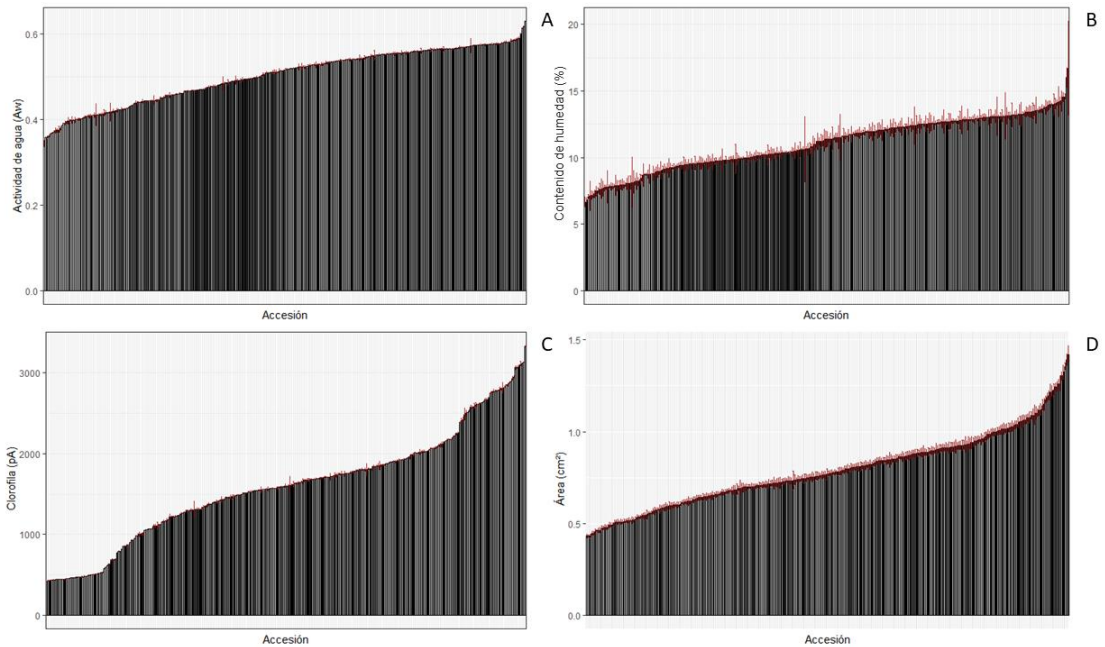


Figura 2. A. Actividad de agua (A_w), B. Humedad (%), C. Clorofila (pA) y D. Área (cm^2) evaluados en 300 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE. Se muestra el promedio (ordenado de menor a mayor fenotipo) y las barras de error (color rojo) representan el error estándar (SE).

Se observó una amplia gama de colores en las accesiones evaluadas. Las accesiones presentaron semillas de color negro ($R=0$, $G=0$, $B=0$) hasta color blanco ($R=255$, $G=255$, $B=255$) (Figura 3). Además, se logró presenciar una gran mezcla de colores en algunas semillas (Figura 4).

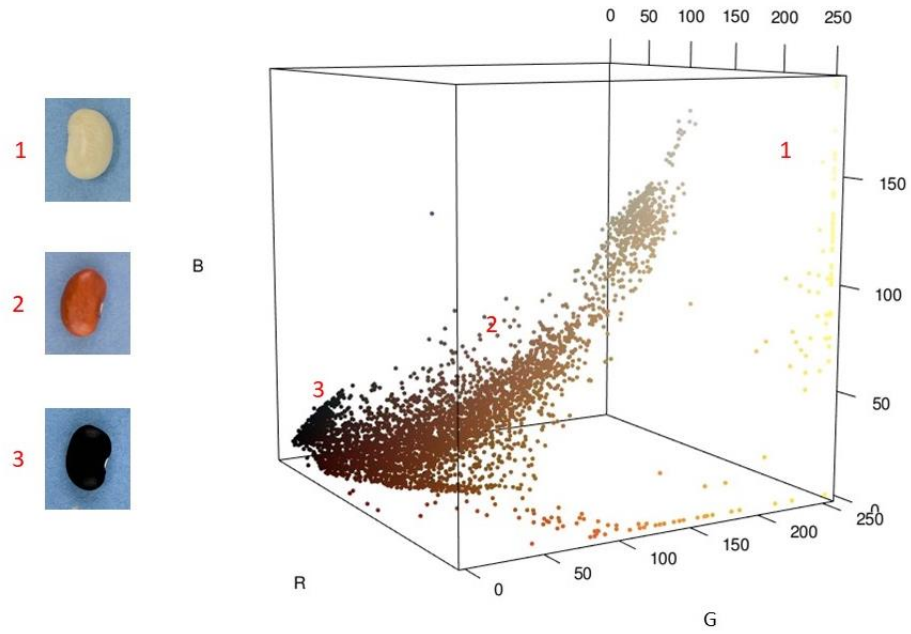


Figura 3. Representación 3D de los colores rojo (R), verde (G por el inglés “Green”), azul (B, por el inglés “Blue”) determinados en 300 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE.



Figura 4. Set demostrativo (40 accesiones) de la diversidad de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provenientes del banco de germoplasma del CIAT y almacenadas por 30 años en el CATIE, junto con las variedades Cabécar (Rojo) y Brunca (Negro) de Costa Rica. Las semillas proceden de diversos países (CR= Costa Rica, MEX= México, GTM= Guatemala, HND= Honduras, NIC= Nicaragua, ECU= Ecuador, PER= Perú, ARG= Argentina, BRA= Brasil, ESP= España, TUR= Turquía, SYR= Siria, IRN= Irán, UGA= Uganda, TZA= Tanzania, ZMB= Zambia).

6.2 Optimización de las condiciones para las pruebas de germinación

Se realizaron ensayos de germinación con dos genotipos diferentes Cabécar (Rojo) y Brunca (Negro) con el fin de optimizar las condiciones para posteriormente sembrar las 300 accesiones pertenecientes al CIAT. En el primer conteo de la primera prueba sin optimizar, el porcentaje de semillas germinadas de color negro varió entre 25% y 95% según el lugar donde estaban en el estante, el genotipo de color rojo no presentó ninguna semilla germinada. Para el segundo conteo, el porcentaje de germinación en semillas tanto negras como rojas varió entre 70% y 100%. En la prueba final, luego de optimizar la cantidad de luz en el estante, el porcentaje de semillas de color negro germinadas varió entre 90% y 100% y el de semillas rojas entre 0% y 15%. En el segundo conteo, la germinación de genotipos rojo y negro varió entre 95% y 100% (Figura 5).

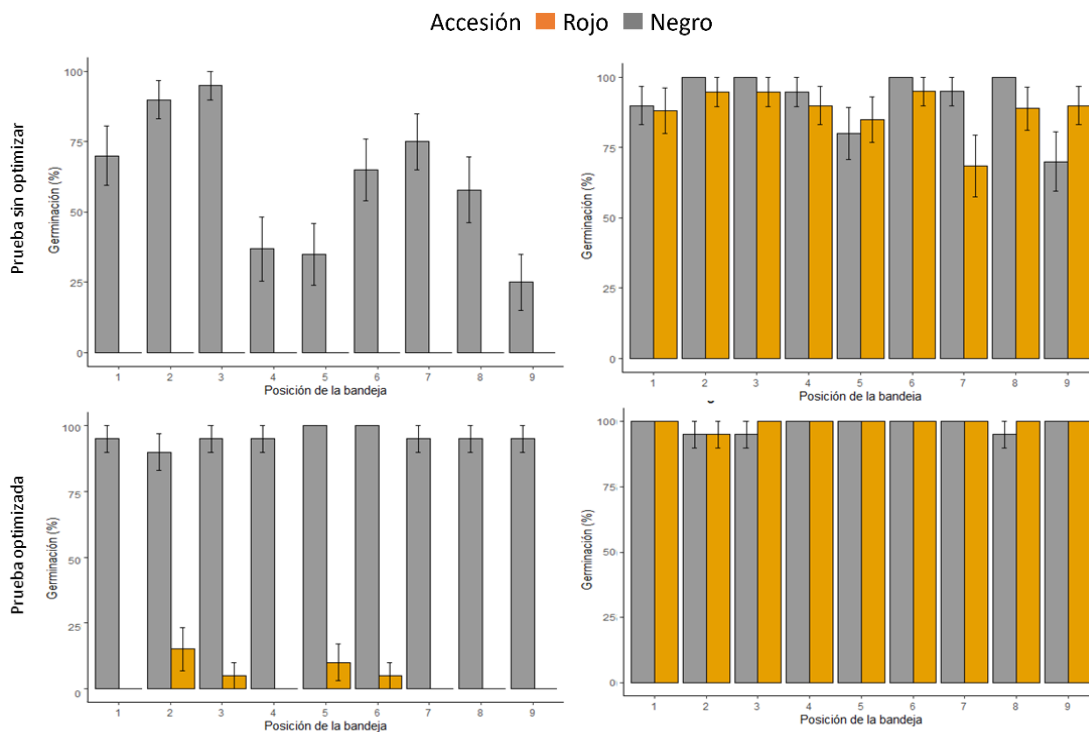


Figura 5. Porcentaje de semillas germinadas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). El primer conteo fue evaluado a los siete días después de la siembra. El segundo conteo fue evaluado 14 días después de la siembra. Las bandejas se colocaron en distintos estratos del estante. Se muestra el promedio y las barras de error representan el error estándar (SE).

6.3 Viabilidad de las accesiones del CIAT

Se observó una alta variabilidad en el vigor de las accesiones de frijol, medido a partir de la cuantificación de la germinación a los siete días después de la siembra. De las 300 accesiones evaluadas, 37 accesiones no germinaron para este primer conteo, mientras que un 15% presentó una germinación mayor al 85% (Figura 6).

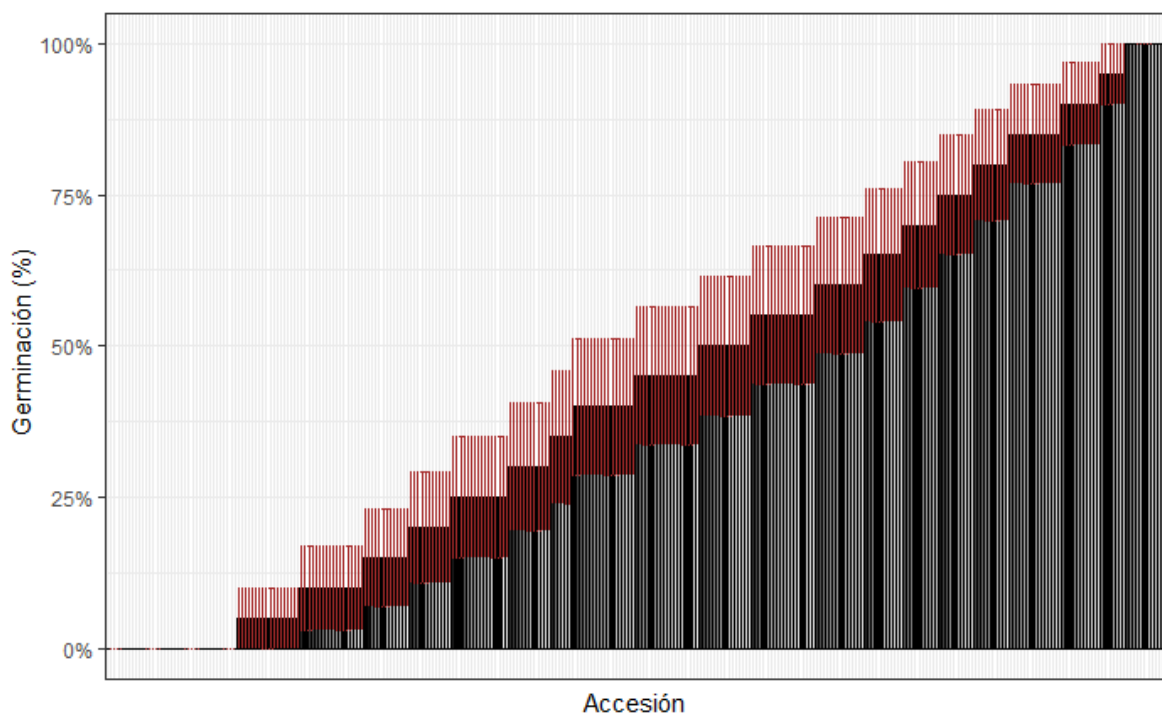


Figura 6. Porcentaje de semillas germinadas (plántulas normales) en el primer conteo, evaluado a los siete días después de la siembra, en 300 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE. Se muestra el promedio (ordenado de menor a mayor porcentaje de germinación) y las barras de error (color rojo) representan el error estándar (SE).

Un 99,7% de las accesiones evaluadas germinaron a los 14 días (Figura 7). La germinación se evaluó como el porcentaje de plántulas normales (Figura 8). Solamente la accesión G11819 no germinó. En las semillas germinadas los porcentajes de germinación

variaron entre 15% y 100%. Un 73% de las accesiones presentó un porcentaje de germinación superior al 85%; un 32% de las accesiones germinaron un 100%.

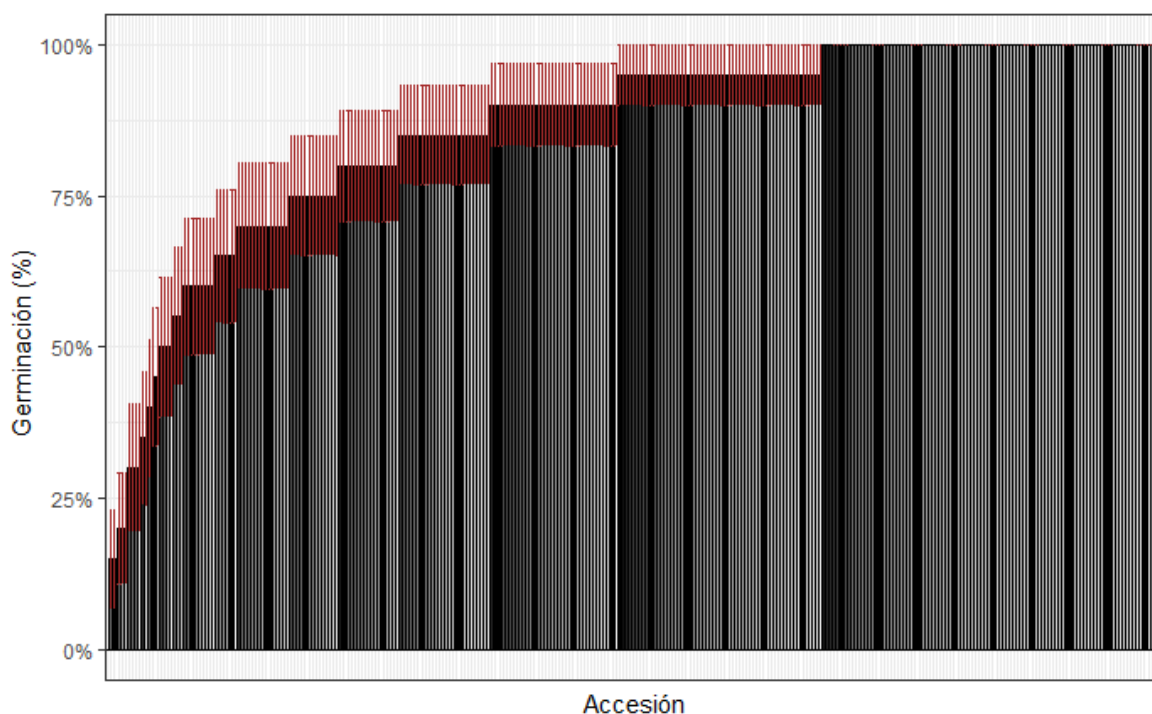


Figura 7. Porcentaje de semillas germinadas (plántulas normales) de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en el segundo conteo, evaluado a los 14 días después de la siembra, en 300 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE. Se muestra el promedio (ordenado de menor a mayor porcentaje de semillas germinadas) y las barras de error (color rojo) representan el error estándar (SE).



Figura 8. A y B. Plántulas (normal) germinadas a partir de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) proveniente del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE.

Un 52% de las accesiones presentó plántulas anormales al germinar (Figura 9), sin embargo, en porcentajes bajos (0% - 40%) (Figura 10). Sólo la accesión G15293 presentó un porcentaje elevado (80%).



Figura 9. A y B. Plántulas (anormal) germinadas a partir de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE.

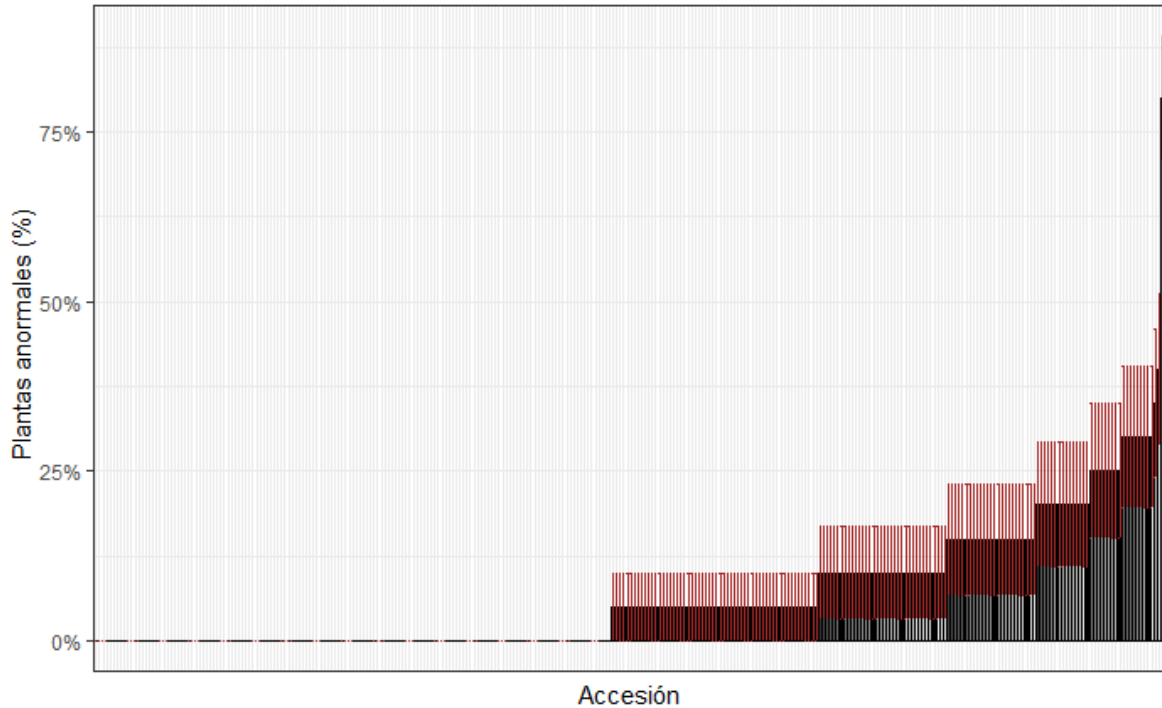


Figura 10. Porcentaje de plántulas anormales de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en 300 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE, evaluado 14 días después de la siembra. Se muestra el promedio (ordenado de menor a mayor porcentaje de plántulas anormales) y las barras de error (color rojo) representan el error estándar (SE).

Más de la mitad de las accesiones (52%) no presentaron semillas muertas. Un 48% mostró valores entre 5% y 100%. Los resultados de este porcentaje (48%) se desglosan de la siguiente manera: 45% corresponde a valores de 5% a 50%, 2% valores de 55% a 85% y 1% al 100% (Figura 11). La accesión que presentó todas sus semillas muertas fue la G11819.

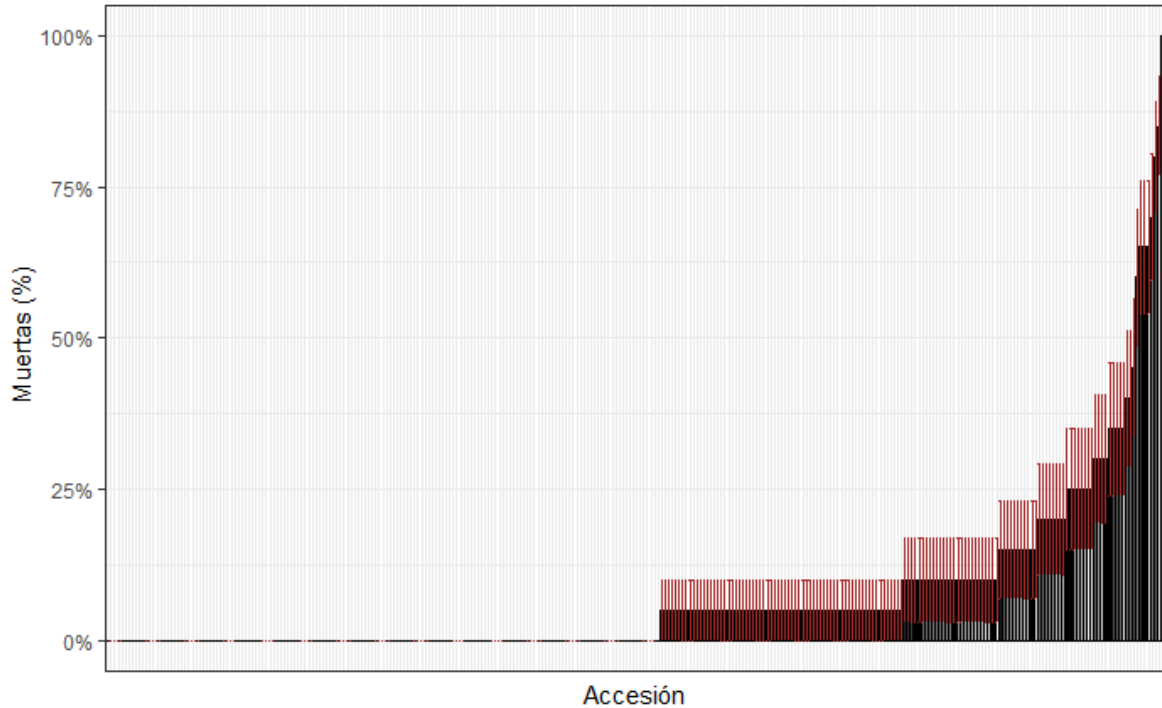


Figura 11. Porcentaje de semillas muertas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en 300 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE, evaluado 14 días después de la siembra. Se muestra el promedio (ordenado de menor a mayor porcentaje de semillas muertas) y las barras de error (color rojo) representan el error estándar (SE).

La imbibición de las semillas de frijol, evaluada a las 17 horas, mostró valores en rangos mínimos y máximos de 1,11 y 2,23 respecto a la imbibición. Un 50% de las accesiones estuvo en el rango de 1,4 a 1,5 (Figura 12). La accesión G12041 presentó la imbibición más baja mientras que la accesión G13935 la más alta.

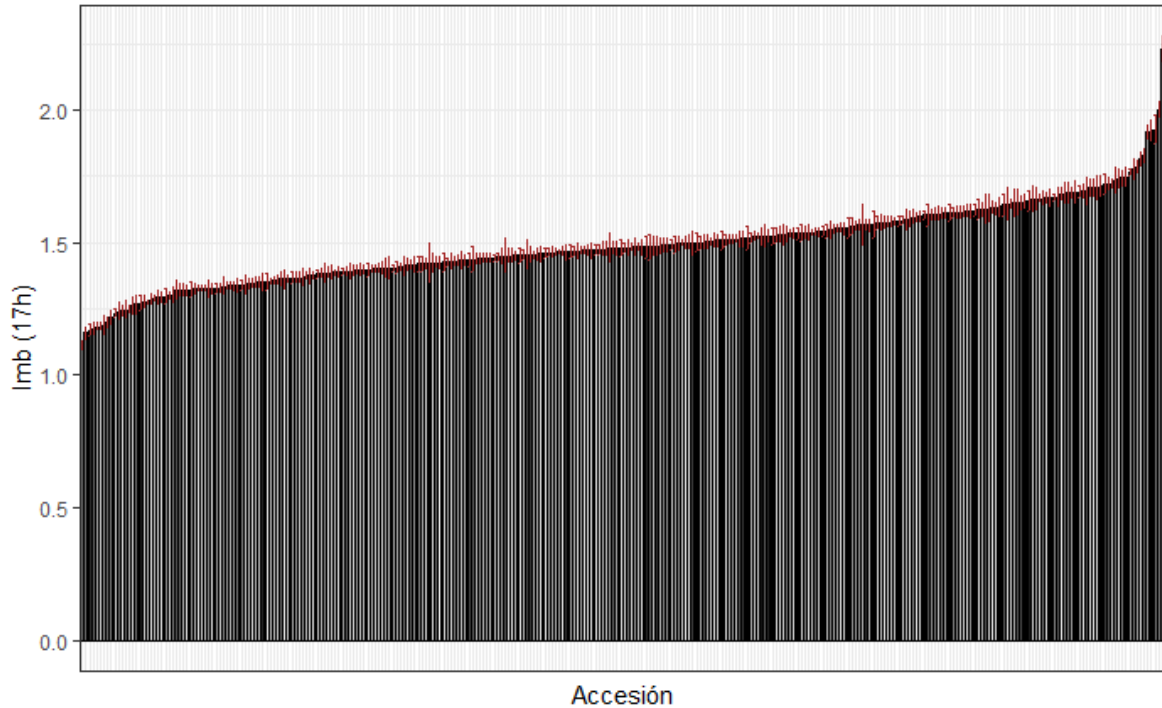


Figura 12. Imbibición de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en 300 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE, evaluado a las 17 horas de imbibición. Se muestra el promedio (ordenado de menor a mayor imbibición) y las barras de error (color rojo) representan el error estándar (SE).

Se graficó la curva del promedio de las 300 accesiones a las 17 horas de imbibición con valor mínimo de 1,11 y valor máximo de 2,23 (Figura 13A). La tasa de imbibición fue de 1,50 con el modelo de Gompertz (Figura 13B). La tasa de imbibición del valor mínimo es de 1,52 con el modelo de Gompertz (Figura 13C). La tasa de imbibición del valor máximo es de 2,39 con el modelo de Gompertz (Figura 13D).

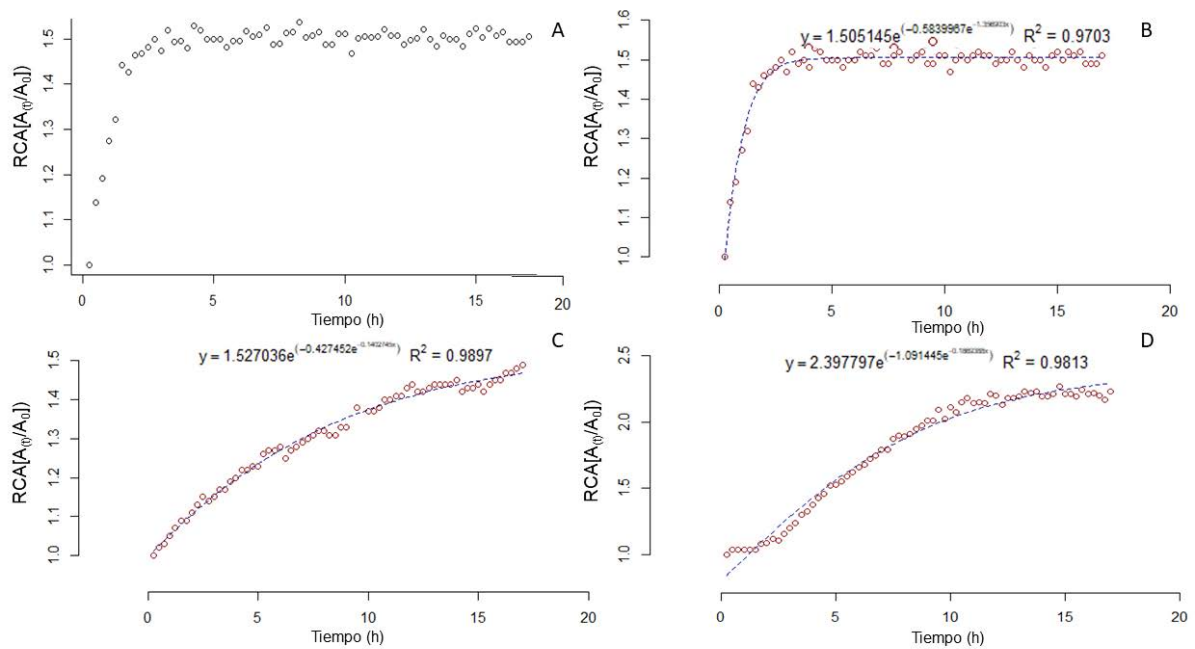


Figura 13. Razón de crecimiento del área de las semillas a través del tiempo (17 horas) en 300 accesiones. A. curva de imbibición promedio de 300 accesiones. B. curva de imbibición con el modelo de Gompertz. C. curva de imbibición de valor mínimo con el modelo de Gompertz. D. curva de imbibición con el valor máximo con el modelo Gompertz.

6.4 Correlaciones entre propiedades y viabilidad de las semillas

Se realizó un análisis de correlación con las distintas variables estudiadas en las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y su proceso de germinación (Figura 14). Para todas se utilizó el valor 0,05 de significancia. Se observó una fuerte correlación positiva ($\rho = 0,89$) entre la actividad de agua (A_w) y el contenido de humedad (CH). También se observaron correlaciones positivas entre los colores G y R (0,96), G y B (0,82). El conteo a los siete días después de la siembra (primer conteo) presentó una correlación negativa con el área de la semilla (-0,46). El área de la semilla mostró una correlación negativa

con el proceso de imbibición (-0,36) y el segundo conteo tuvo correlaciones negativas con las semillas muertas (-0,77) y las plántulas anormales (-0,80).

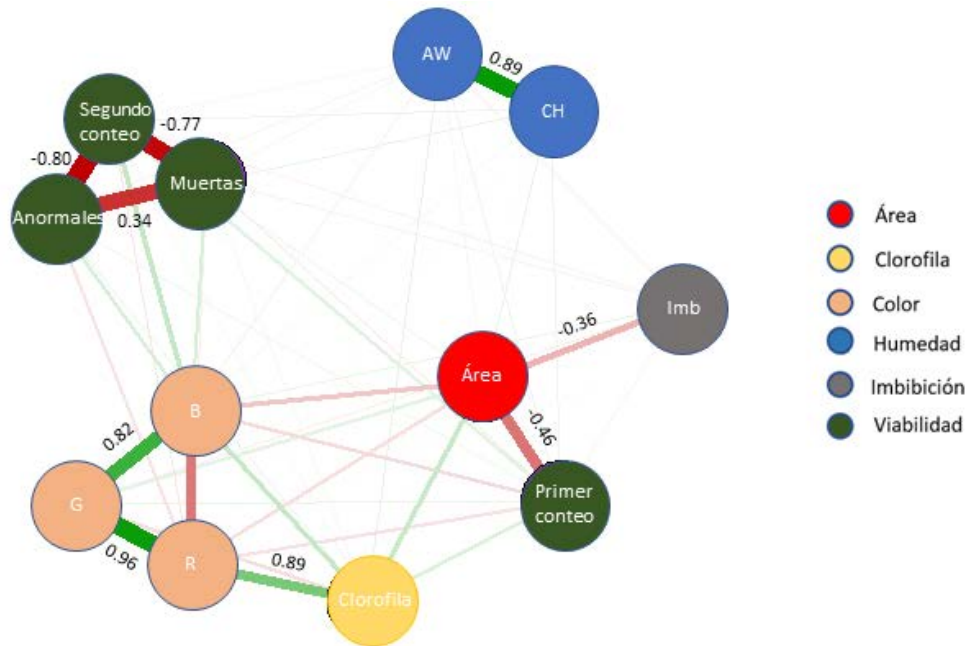


Figura 14. Red de correlaciones (método Spearman) para distintas variables evaluadas en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) que representan el fenotipo de 300 accesiones de frijol provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE. Las líneas de color verde representan una correlación positiva. Las líneas de color rojo representan una correlación negativa. El grosor de la línea representa el grado de significancia. Se muestran los valores para las correlaciones significativas a un valor de $P \leq 0,05$.

A partir de la ecuación $y = -2,55 + 27,16Aw$ se obtuvo una relación lineal entre la actividad de agua (Aw) y el contenido de humedad (CH). Es decir, conforme aumenta la actividad de agua del mismo modo aumenta el contenido de humedad en las semillas (Figura 15).

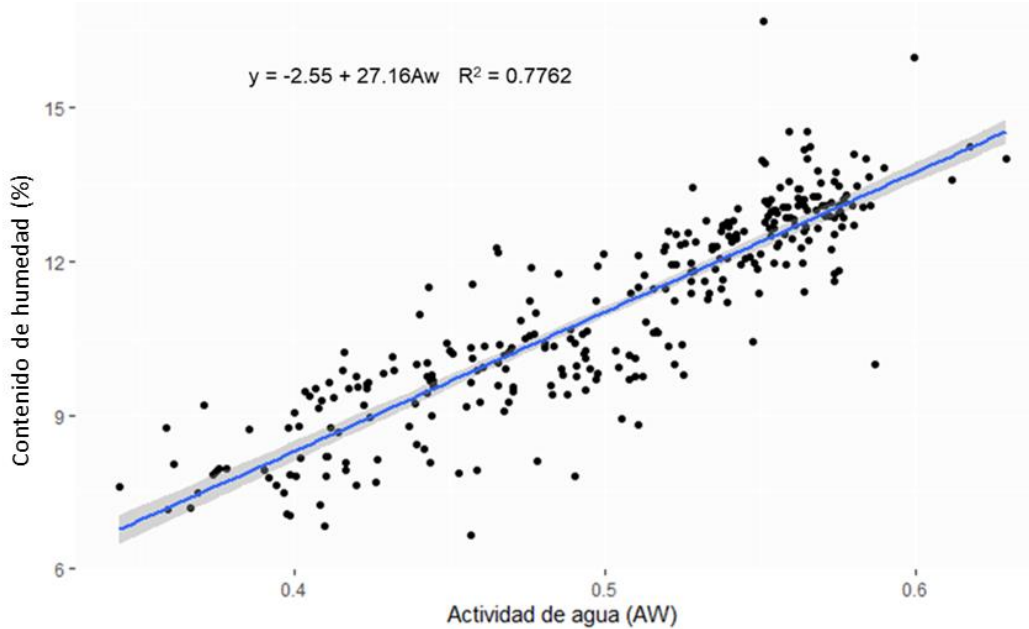


Figura 15. Relación creciente entre la actividad de agua (A_w) y el contenido de humedad (%), determinadas en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Evaluado en 300 accesiones (Acc). La línea azul indica la regresión lineal, mientras que la franja gris es el intervalo de confianza.

6.5 Microscopía electrónica en accesiones con baja y alta imbibición

Se observaron las estructuras lente, hilo y micrópilo presentes en un frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Figura 16A-C) así como microfisuras en la lente (Figura 16D). En las accesiones de baja y alta imbibición se pudo observar la presencia de microfisuras, así como la ausencia de estas (Figura 17). Sin embargo, la longitud de las microfisuras en la accesión de alta imbibición (G11787) fue aproximadamente el doble que en la accesión de baja imbibición (G12858A) siendo $496 (\pm 122,01) \mu\text{m}$ y $239 (\pm 65,92) \mu\text{m}$ los valores respectivos.

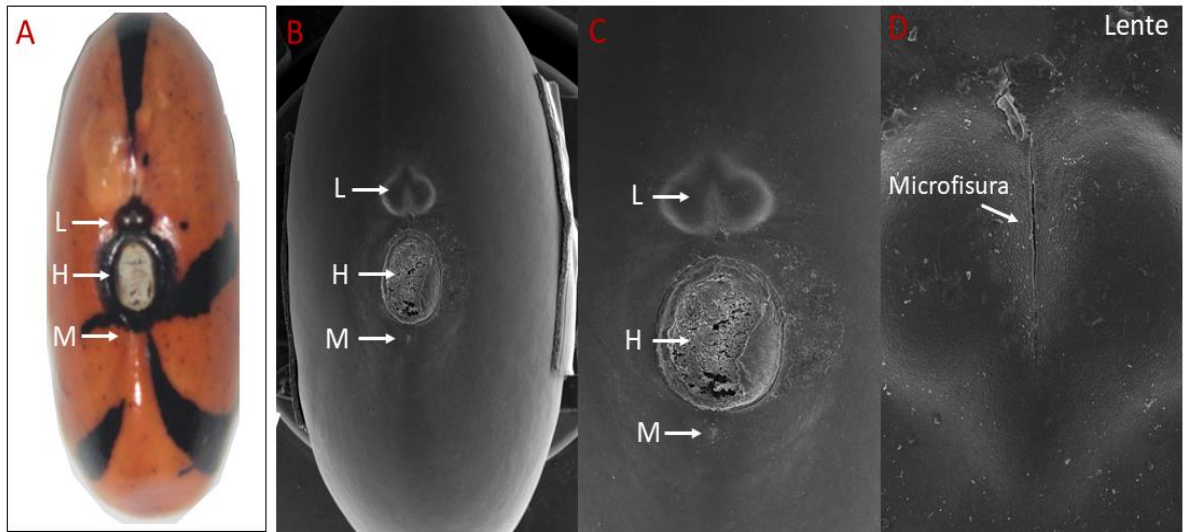


Figura 16. A. Imagen lateral de una semilla de frijol G11811 (*Phaseolus vulgaris*). B, C, D. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las estructuras de una semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris*) a diferentes distancias de enfoque. Se señalan las siguientes estructuras: L = Lente, H = Hilo, M = Micrópilo.

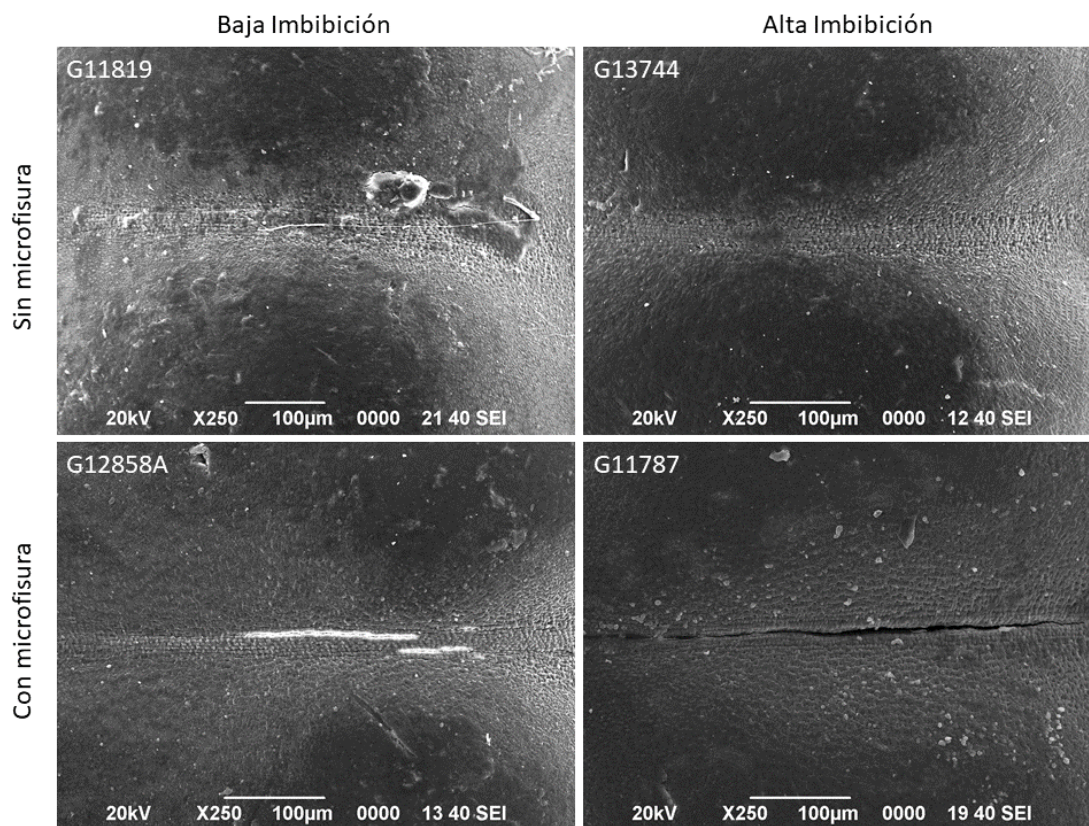


Figura 17. Imágenes de microscopía electrónica de barrido en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) que presenta imbibición (baja y alta) sin y con presencia de microfisuras. Las microfisuras se observan en la estructura de la lente del frijol.

6.6 Presencia de hongos observados en las accesiones

Con el uso del microscopio electrónico de barrido también se pudo observar la presencia de hifas en dos accesiones G12041 y G11819 (Figura 18). Para la identificación de los hongos se tomó el micelio (Figura 19) obtenido a partir de las semillas de frijol, y se extrajo ADN. Se realizó un PCR con el ADN extraído (Figura 20) para luego realizar la identificación mediante secuenciación. En la accesión G12041 se pudieron identificar los siguientes hongos: *Rhizopus arrhizus*, *Aspergillus flavus* y *Syncephalastrum racemosum*. En la accesión G11819 solo se encontró la presencia de *Aspergillus clavatus*.

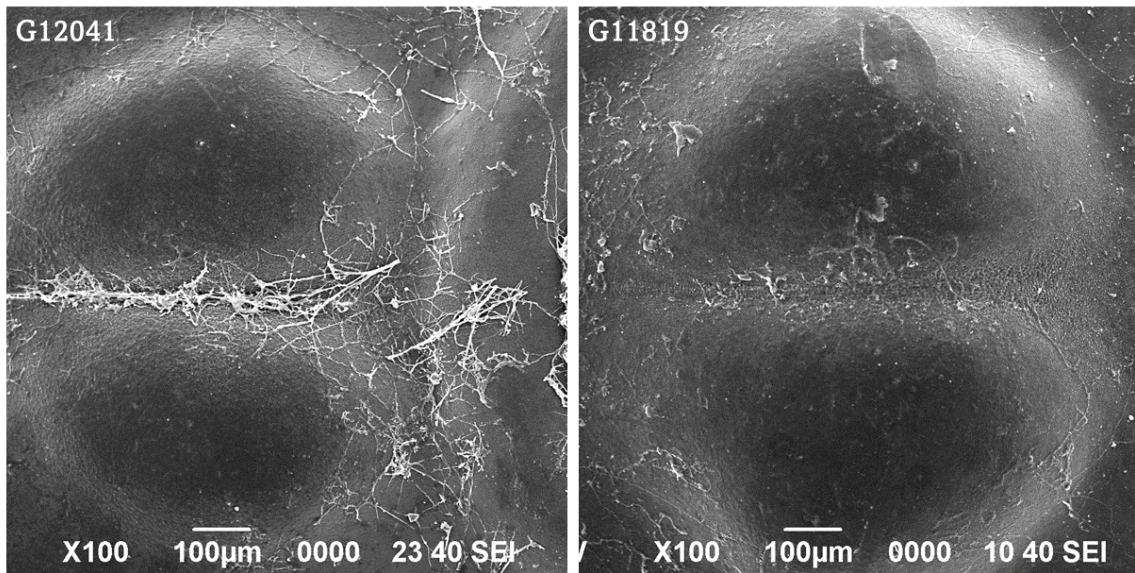


Figura 18. Imágenes de microscopía electrónica de barrido en dos accesiones (G12041 y G11819) de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) que presentan hifas. En la imagen se observa la estructura de la lente del frijol.

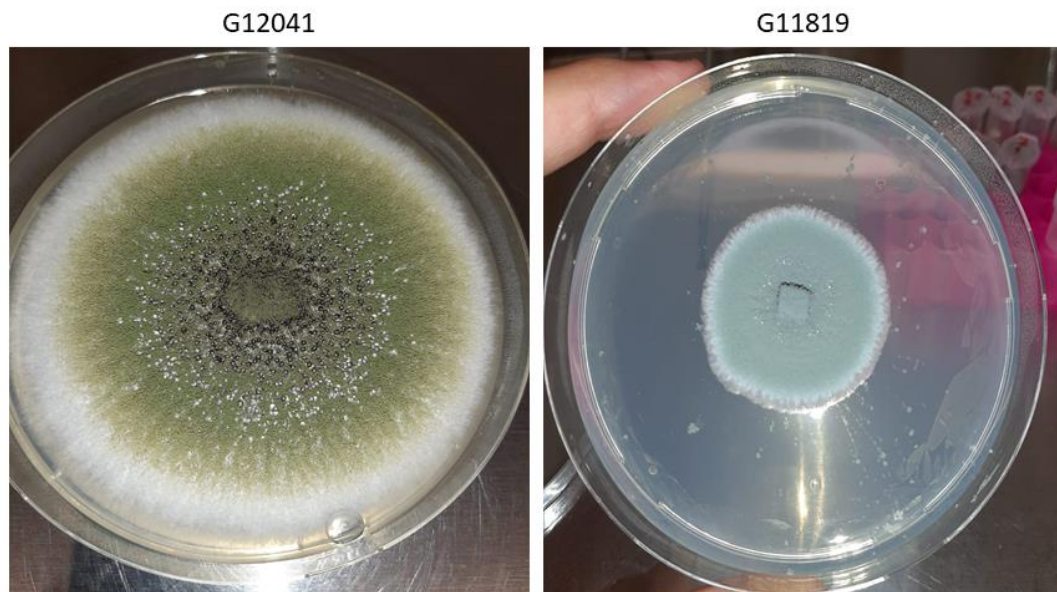


Figura 19. Caja Petri con micelio presente en dos accesiones (G12041 y G11819) de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

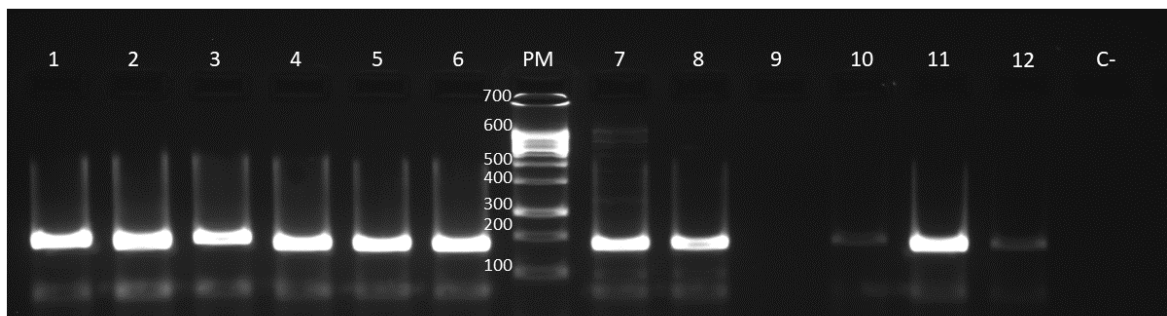


Figura 20. Bandas de ADN obtenido del micelio de dos accesiones (G12041 y G11819) de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Se muestra un marcador del peso molecular (PM) y un control negativo (C-). Las bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10 y 11 corresponden a la accesión G12041. Las bandas 7, 8 y 12 corresponden a la accesión G11819.

6.7 Comparación del análisis de semillas de manera individual y muestral

Se realizó un análisis de correlación (muestral e individual) con las distintas variables estudiadas en las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y su proceso de germinación (Cuadro 1). Para todas se utilizó el valor 0,05 de significancia.

En el análisis individual de las semillas, las composiciones de colores G-R y G-B tuvieron correlaciones de 0,96 y 0,81 respectivamente. Mientras que en el muestral se obtuvo un comportamiento similar, solo varió las composiciones de los colores G y B (0,82).

Tanto de manera muestral como individual el área de la semilla se correlacionó de manera negativa respecto a la imbibición y la germinación a los siete días (primer conteo), solo que a diferente escala. De forma individual, el primer conteo presentó una correlación negativa con el área de la semilla (-0,28). El área de la semilla respecto al proceso de imbibición (-0,30). Luego de manera muestral el área de la semilla tuvo correlaciones negativas con el primer conteo (-0,46) y el proceso de imbibición (-0,36).

A los 14 días después de la siembra (segundo conteo) tanto en el análisis individual como muestral presentó correlaciones negativas respecto a las semillas muertas y las plántulas anormales, solo que a diferente escala, de forma individual fueron (-0,69) y (-0,66) respectivamente, y de forma muestral (-0,77) y (-0,66).

Cuadro 1. Correlaciones (método Spearman) muestrales e individuales para distintas variables evaluadas en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y su proceso de germinación. Los datos representan el fenotipo de 300 accesiones de frijol (*Phaseolus vulgaris*) provenientes del banco de germoplasma del CIAT que estuvo almacenado por 30 años en el CATIE. Los datos en rojo representan las correlaciones significativas ($P \leq 0,05$).

	Área (cm ²)	Primer conteo	Germinación (segundo conteo)	Plántulas anormales	Plántulas muertas	R	G	B	Imbibición	
Individual	Área (cm ²)	-0.46	0.02	-0.09	0.06	0.09	0.07	-0.04	-0.36	
	Primer conteo	-0.28	0.34	-0.15	-0.39	-0.19	-0.17	-0.09	0.17	
	Germinación (segundo conteo)	-0.01	0.34		-0.80	-0.77	-0.15	-0.10	0.04	-0.05
	Plántulas anormales	-0.03	-0.22	-0.66		0.34	0.08	0.06	0.00	0.10
	Plántulas muertas	0.05	-0.24	-0.69	-0.07		0.13	0.10	-0.01	-0.03
	R	0.08	-0.11	-0.07	0.04	0.06		0.96	0.71	-0.08
	G	0.05	-0.08	-0.06	0.04	0.04	0.96		0.82	-0.08
	B	-0.06	-0.03	0.02	0.02	-0.04	0.71	0.81		0.00
	Imbibición	-0.30	0.13	0.02	0.02	-0.05	-0.07	-0.06	0.01	
	Muestral									

7. Discusión

7.1 Determinación de la viabilidad de 300 accesiones de frijol

Las accesiones evaluadas provienen de distintas partes del mundo (Figura 1). Se pudo observar una gran variabilidad en factores como: actividad de agua (A_w), contenido de humedad (%), clorofila (pA) y área (cm²) (Figura 2).

La actividad de agua (A_w) y contenido de humedad (%) son parámetros importantes de la calidad de la semilla. El A_w se encuentra fuertemente relacionada con la velocidad y la intensidad en el deterioro de las semillas de frijol (Francisco y Usberti, 2008). El valor de A_w de 0,35 es universal para el almacenamiento seguro de semillas ortodoxas, debido a que los principales factores de degradación son menos activos. Lo cual permite evitar el desarrollo de agentes bióticos y mantener las reacciones químicas en niveles bajos (Baldet y Colas, 2013). Los valores de A_w obtenidos (Figura 2A) no son los óptimos para el almacenaje, ya que estuvieron en un valor promedio de 0,50 sin embargo, son valores adecuados para evitar el desarrollo de bacterias u hongos (Baldet et al., 2007).

Las semillas presentaron un contenido de humedad de 6,67% a 16,68% (Figura 2B), no obstante, solo dos accesiones presentaron valores mayores al 14,5%. Rani et al. (2013) reportaron porcentajes de germinación superiores al 85% en frijoles con contenidos de humedad de 12% y 14% almacenados a temperaturas de 10 y 20 °C; sin embargo, observaron una disminución en el porcentaje de germinación cuando las muestras presentaban contenidos de humedad de 16, 18 y 20% a temperaturas de almacenaje mayores a 20 °C. Francisco y Usberti (2008) también demostraron la pérdida de viabilidad en semillas de frijol conforme aumentaba la humedad, siendo este efecto más notable en semillas con contenidos mayores al 16,2% .

Las accesiones evaluadas presentaron una amplia gama de colores (Figura 3), también de manera visual se observó una gran diversidad en factores como color, tamaño, forma (Figura 4).

Se realizaron pruebas preliminares con genotipos rojo y negro, los cuales se encontraban almacenados en el CIGRAS, estos poseían un porcentaje de germinación del 95%. El objetivo de estos ensayos fue determinar si las pruebas de germinación eran homogéneas para la germinación de las semillas, ya que este proceso, así como la velocidad con la que ocurre, se ve influenciado por humedad del sustrato, temperatura y luz, entre otras (Caroca et al., 2016). En las pruebas preliminares, se observó mucha variabilidad en los porcentajes de germinación entre el primer conteo y el segundo conteo de la primera prueba (Figura 5). Al regular la cantidad de luz se logró minimizar las diferencias observadas en los distintos estratos. Este factor se pudo regular con el uso de malla de sarán, la cual permite regular varias intensidades lumínicas dependiendo del grado de la malla (Rubio y Navarro, 2018). Para el segundo conteo de la prueba optimizada los porcentajes de germinación fueron más estables, con lo cual se pudo observar que el ambiente y el uso de diferentes estratos del estante no tuvieron influencia en la germinación, debido a que las diferencias entre el primer y segundo conteo se pueden atribuir al vigor que posee cada genotipo y no a las condiciones brindadas (luz, agua, sustrato).

En las pruebas de germinación de las accesiones del CIAT se observó una gran variabilidad en los porcentajes de germinación del primer y segundo conteo. Para el primer conteo solo el 15% de las accesiones presentó porcentajes de germinación mayores al 85% (Figura 6), para el segundo conteo este dato incrementó a un 73% (Figura 7), lo cual evidencia una pérdida en vigor de la semilla. El primer conteo de germinación se puede considerar una prueba de vigor, ya que, al iniciarse el proceso de deterioro primero se afecta la velocidad de germinación de la semilla y no los resultados finales de la germinación (Da silva et al., 2014). Por ello, las accesiones que presentan valores más altos de germinación durante la evaluación del primer conteo se pueden tomar como accesiones más vigorosas con respecto a las accesiones que presentan una germinación más retrasada. (Silva y Vieira, 2006).

Si bien, el vigor de las accesiones se vio afectado, la conservación de la semilla ha sido adecuada, ya que las accesiones poseen más de 30 años de almacenamiento y

actualmente un 73% de las accesiones presentan una germinación mayor al 85%. Esto al tomar en cuenta que en un banco de germoplasma la viabilidad no debe ser menor al 85% (FAO, 2014). Bajo este concepto 78% de las accesiones todavía son viables. Las semillas deben ser almacenadas en las condiciones idóneas según cada especie, por lo tanto, los bancos de germoplasma poseen ambientes controlados con el fin de poder mantener la viabilidad de las semillas por largos periodos de tiempo. Para poder preservar el material toman en cuenta aspectos como calidad inicial de la semilla, contenido de humedad y temperatura de almacenamiento (Rao et al., 2007). En el caso del frijol al ser una semilla ortodoxa puede ser almacenada a bajas temperaturas y baja humedad por largos periodos de tiempo (Solís y Velázquez, 2019). El contenido de humedad de esta semilla puede reducirse en un rango de 4% a 6% y se puede almacenar en cuartos con una temperatura entre -15 y -20°C y a una humedad relativa de 10-15% (Reveles y Velásquez, 2017).

Las accesiones evaluadas presentaron 52% de plantas anormales (Figura 9) y 48% de semillas muertas (Figura 11), sin embargo, estos porcentajes estuvieron en rangos bajos por accesión. Esto indica una buena manipulación de la semilla. Un mal almacenamiento de la semilla no solo se ve reflejado en la pérdida de viabilidad y capacidad de germinación, también afecta el óptimo desarrollo de la plántula provocando que sea considerada anormal (Vindas, 2018).

7.2 Relación entre semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) y su proceso de imbibición

La prueba de imbibición y la prueba de germinación no presentan correlación alguna (Figura 14). Este resultado no concuerda con el reportado por Miller et al. (2018) donde mencionan una fuerte correlación positiva (r de Pearson = 0,70, $p = 1,66 \times 10^{-5}$) entre la imbibición y la germinación de semillas de maíz. Sin embargo, Monroy et al. (2017) recalcan que para llevarse a cabo el proceso de germinación es necesaria la fase de imbibición, no obstante, el proceso de imbibición no asegura la germinación de una semilla, ya que este puede suceder en semillas no viables, es decir las semillas muertas también absorben agua. Sin embargo, la velocidad de absorción de estas semillas difiere

a la presente en semillas viables (Yim y Bradford, 1998). Otro factor que pudo influir en la absorción de agua por parte de la semilla fue el proceso de escarificación, ya que alteró la cubierta seminal y permitió la entrada de agua (Varela y Arana, 2011). La permeabilidad de la testa posee una gran influencia sobre la imbibición de la semilla. Es así como semillas de testa permeable pueden absorber agua independientemente si son viables o no (Maldonado et al., 2018).

7.3 Correlaciones entre propiedades evaluadas

Se observaron correlaciones importantes entre la imbibición y el área de la semilla; primer conteo y área; y entre actividad de agua y contenido de humedad; la clorofila y los colores RGB (Figura 14). El área de las semillas de frijol se correlaciona de manera negativa con la imbibición y la germinación. En la mayoría de los casos el tamaño de la semilla se relaciona directamente con el grosor de la cubierta seminal y de manera opuesta con la absorción de agua. Un incremento en el tamaño de la semilla involucra una pérdida en la relación superficie: volumen, dando como resultado una semilla con menor capacidad en la absorción de agua y el proceso de germinación. Entonces semillas más pequeñas poseen capas más delgadas lo que implica una superficie relativa más alta, este atributo otorga una mayor permeabilidad a la semilla y una disminución en el tiempo necesario para el proceso de germinación (Souza y Fagundes, 2014).

Se encontró una fuerte correlación entre la actividad de agua y el contenido de humedad (0,89). En las semillas el contenido de humedad tiene gran impacto sobre la conservación y la longevidad. El valor del contenido de humedad posee dos fundamentos principales: el primero sería mantener el valor mínimo adecuado con el fin de preservar la vida de la semilla, y el segundo es evitar que sobrepase un valor máximo, para poder conservar su longevidad (Craviotto et al., 2011). La actividad de agua (A_w) y la determinación del contenido de humedad son dos parámetros utilizados para evaluar la calidad de las semillas (Baldet y Colas, 2013). Estos poseen una relación creciente, al aumentar la actividad de agua aumenta el porcentaje de humedad en las semillas (Figura

15). Sin embargo, la prueba del contenido de humedad se podría sustituir por el método de Actividad de agua (A_w), ya que, esta última presenta ventajas, como la facilidad y rapidez al implementarla; es no destructiva, lo cual es una gran ventaja para situaciones donde se cuente con poca semilla o semillas de gran valor (Baldet et al., 2009).

El contenido de clorofila en la semilla puede ser utilizada como un indicador en calidad. En la mayoría de las especies el contenido de clorofila en la semilla se reduce durante la maduración (Groot et al, 2006). El estado de madurez es una propiedad importante en la semilla, ya que, las semillas inmaduras o que se encuentran incompletas en su maduración son comúnmente de menor calidad que semillas maduras (Jalink et al, 1998). También cabe la posibilidad que a medida que envejece la semilla se dé una pérdida en la fluorescencia de la clorofila (de Oliveira et al, 2022). Esto puede sugerir la existencia de un punto óptimo de clorofila en la semilla. La clorofila puede ser utilizada como un atributo de calidad, sin embargo, en este estudio no fue conclusivo, ya que no se observó correlación alguna.

7.4 Microfisuras en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L)

Se realizaron pruebas de microscopía electrónica de barrido en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de alta (mayor a 1,7) y baja (menor a 1,5) imbibición, con el fin de comprender de una mejor manera el proceso de imbibición en la semilla. Las microfisuras se observaron en la lente del frijol (Figura 16). Independientemente, si la accesión era de baja o alta imbibición se observó la presencia de microfisuras, así como la ausencia de estas (Figura 17). No obstante, las accesiones de alta imbibición presentaron microfisuras de mayor longitud (496 μm) que las accesiones de baja imbibición (239 μm), aproximadamente el doble. Estos resultados concuerdan con los reportados por Soltani et al. (2021) donde realizaron pruebas en genotipos de rápida y lenta absorción; en ambos genotipos encontraron microfisuras sobre la lente del frijol, donde el área de las microfisuras (μm^2) en genotipos de rápida absorción era mayor que en genotipos de lenta

absorción. Estas microfisuras también se han estudiado en semillas de soya, donde han sido relacionadas con la permeabilidad del agua (Ma et al., 2004). Las microfisuras han sido observadas en regiones que se caracterizan por ser los principales sitios de entrada de agua (Lechowska et al., 2019). Es escasa la información publicada sobre la función que ejercen estas microfisuras en la semilla, sin embargo, con los resultados observados se puede establecer que poseen una relación con la absorción de agua en la semilla.

7.5 Hongos observados en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L)

Al realizar las pruebas de microscopía electrónica de barrido se encontró la presencia de hifas en dos accesiones G12041 y G11819 (Figura 18). Los géneros de hongos identificados fueron: *Rhizopus arrhizus*, *Aspergillus flavus*, *Syncephalastrum racemosum* y *Aspergillus clavatus*. Algo importante a destacar, es que estas accesiones (G12041 y G11819) poseen porcentajes bajos de germinación del 55% y 0% respectivamente. Estos valores se pueden atribuir a la presencia de los hongos, ya que, el desarrollo de hongos en semillas almacenadas puede dar como consecuencia una fuerte reducción en poder germinativo y un daño en el embrión (Erazo, 2004). También géneros de hongos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, son capaces de producir micotoxinas que afectan directamente la capacidad de la semilla para germinar debido a un efecto fitotóxico (Ismail y Papenbrock, 2015).

7.6 Análisis individual y análisis muestral de la semilla

Si el comportamiento de las semillas se mantiene, se puede reducir la muestra, dado que los resultados del análisis con el espacio muestral de 10 semillas son similares a los resultados obtenidos de forma individual (cuadro 1), pero cabe rescatar que depende de las mediciones que se desean realizar no es viable hacer esta reducción porque existe un mínimo de semillas para poder llevar a cabo la medición, por ejemplo, la prueba de contenido de humedad y análisis de clorofila. Otro punto importante para considerar es que el tamaño de muestra que se utilizó no es el oficial en ensayos de germinación, ya

que, ISTA (2016) establece que para la prueba de germinación se necesita una muestra de 400 semillas, sin embargo, como se contó con 50 semillas en total se redujo la muestra a 10 semillas.

8. Conclusiones

El vigor de las accesiones disminuyó, sin embargo, la conservación de la semilla fue adecuada, esto reflejado por el alto porcentaje de accesiones viables.

No se encontró correlación entre la prueba de germinación y la prueba de imbibición, lo que indica que no son dependientes entre sí.

El método de Actividad de agua (A_w) mostró ventajas sobre la prueba del contenido de humedad. Debido a esto, la prueba del contenido de humedad puede ser sustituida por el método de Actividad de agua.

El análisis individual presentó resultados similares al análisis muestral. Esto sugiere, que la cantidad de semilla utilizada en un estudio se podría reducir en caso de ser necesario, sin embargo, se debe realizar más investigación al respecto.

9. Literatura citada

- Baldet, P., y Colas, F. (2013). A water activity-regulated dryer: How to dry seeds or pollen with water and no heat. *Tree seed working group news bulletin-Canadian Forest Genetics Association*, (56), 43-49.
- Baldet, P., Colas, F., y Bettez, M. (2007). Water activity: a new paradigm for seed and pollen management. *Tree seed working group news bulletin-Canadian Forest Genetics Association*, (46), 10-12.
- Baldet, P., Colas, F., y Bettez, M. (2009). Water activity-An efficient tool for seed testing. *Tree seed working group news bulletin-Canadian Forest Genetics Association*, (50), 15-17.
- Bradford, K. J. (2018). Interpreting biological variation: seeds, populations and sensitivity thresholds. *Seed Science Research*, 28(3), 158-167.
- Cárdenas, W., Zuluaga, M., y Lobo, M. (2004). Latencia en semillas de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) y tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (*Solanum betaceum*) Cav. Sendt) como aspecto básico para la conservación y el monitoreo de viabilidad de las colecciones. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 139, 31-41.
- Caroca, R., Zapata, N., Vargas, M. (2016). Efecto de la temperatura sobre la germinación de cuatro genotipos de maní (*Arachis hypogaea* L.). *Chilean journal of agricultural and animal sciences*, 32(2), 94-101.
- Craviotto, M., Arango, M., y Valle, C. (2011). Humedad de la semilla como atributo de calidad. *Para mejorar la producción. Cultivos estivales*, (46), 91-94.
- Cuervo, M., Santaella, M., Carvajal, M., Santos, L. G., Vélez, M., Gereda, J., Gonzáles, J., Libreros, D., Guerrero, J., y Wenzl, P. (2020). Importancia de los bancos de germoplasma. Programa de recursos genéticos.

- Da Silva, A., Deuner, C., Terra, C., Meneghello, G., Madruga, L., Amaral, F. (2014). Accelerated Aging in Tomato Seeds. *American Journal of Plant Sciences*, 5 (11), 1651-1656.
- de Oliveira, G., Mastrangelo, C., Hirai, W., Batista, T., Sudki, J., Petronilio, A., Crusciol, C., y da Silva Amaral, E. A. (2022). An Approach Using Emerging Optical Technologies and Artificial Intelligence Brings New Markers to Evaluate Peanut Seed Quality. *Frontiers in plant science*, 13, 849986-849986.
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos tropicales*, 31(1), 00-00.
- E. Arnhold, "easynls: Easy Nonlinear Model," R Packag. version 5.0, pp. 1–9, 2017.
- Engels, J., y Visser, L. (2007). Guía para el manejo eficaz de un banco de germoplasma- Manuales de Bioersity para Bancos de Germoplasma No. 6 (No. 6). *Bioersity International*.
- Erazo, Á. 2004. Deterioro de calidad física y viabilidad de semillas de maíz (*Zea mays*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), y sorgo (*Sorghum bicolor*) durante su almacenamiento en Zamorano. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agroindustrial. El Zamorano. 57 p.
- FAO. (2014). Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Edición revisada.
- Francisco, F. G., y Usberti, R. (2008). Seed health of common bean stored at constant moisture and temperature. *Scientia Agricola*, 65, 613-619.
- Franco, T. (2008). Los bancos de germoplasma en las Américas. *Recursos Naturales y Ambiente*, 53, 81-84.
- García, F., y Villamil, J. (2001). Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, secretaria general de Estructuras. Madrid. 2-15 p.

- Gómez, I. (2018). Elaboración de un sistema para la toma y análisis automático de imágenes para evaluar el proceso de germinación en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). [Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agrícola y de Biosistemas, Universidad de Costa Rica.] 1-74 p.
- Groot, S., Birnbaum, Y., Rop, N., Jalink, H., Forsberg, G., Kromphardt, C., Wener, s., y Koch, E. (2006). Effect of seed maturity on sensitivity of seeds towards physical sanitation treatments. *Seed Science and Technology*, 34(2), 403-413.
- H. Wickham. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2016.
- Hartmann, H., Kester, D., y Ambrosio, A. (1992). Propagación de plantas: principios y prácticas (No. 968-26-0789-2. 02-A3 LU. FT-PRP. 2.). México: CECSA.
- International Seed Testing Association (ISTA). (2021). International Rules for Seed Testing. In: Chapter 5: Germination test. Bassesrdorf: ISTA 1- 53 p.
- International Seed Testing Association. (2016). Reglas internacionales para el análisis de las semillas.
- Ismail, A y Papenbrock, J. (2015) Mycotoxins: producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. *Agriculture*, 5(3), 492–537.
- Jalink, H., Frandas, A., Schoor, R., y Bino, J. (1998). Chlorophyll fluorescence of the testa of Brassica oleracea seeds as an indicator of seed maturity and seed quality. *Scientia Agricola*, 55, 88-93.
- Joosen, R., Kodde, J., Willems, L., Ligterink, W., van der Plas, L., y Hilhorst, H. (2010). GERMINATOR: a software package for high throughput scoring and curve fitting of Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal*, 62(1),148-159.
- Lechowska, K., Kubala, S., Wojtyła, Ł., Nowaczyk, G., Quinet, M., Lutts, S., y Garneczarska, M. (2019). New insight on water status in germinating *Brassica napus* seeds in relation to priming-improved germination. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 540.

- Ma, F., Cholewa, E., Mohamed, T., Peterson, C., y Gijzen, M. (2004). Cracks in the palisade cuticle of soybean seed coats correlate with their permeability to water. *Annals of Botany*, 94(2), 213-228.
- Maldonado, M., Rojas, A., Torres, N., Garcia De Los Santos, G., García, J., y Herrera, J. (2018). Influencia de la testa sobre la imbibición en endocarpios de *Malpighia mexicana* y *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae). *Cuadernos de Investigación UNED*, 10(1), 151-160.
- Miller, N., Stelpflug, S., Kaeppler, S., y Spalding, E. (2018). A machine vision platform for measuring imbibition of maize kernels: quantification of genetic effects and correlations with germination. *Plant methods*, 14, 115.
- Monroy, M., Peña, C., García, J., Solano, E., Campos, H., y García-Villanueva, E. (2017). Imbibición, viabilidad y vigor de semillas de cuatro especies de *Opuntia* con grado distinto de domesticación. *Agrociencia*, 51(1), 27-42.
- Moreno, F; Plaza, G., y Magnitskiy, S. (2006). Efecto de la testa sobre la germinación de semillas de caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.). *Agronomía Colombiana*, 24(2), 290-295.
- Pérez, P., y Acosta, J. (2002). Permeabilidad de la testa y la porción micrópilo-hilio en semilla de frijol silvestre y cultivado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25(1), 57-63.
- Peters, J (2005). Tetrazolium testing handbook. Handbook on seed testing, 6th edn. Association of Official Seed Analysts (AOSA).
- Rani, P. R., Chelladurai, V., Jayas, D. S., White, N. D. G., y Kavitha-Abirami, C. V. (2013). Storage studies on pinto beans under different moisture contents and temperature regimes. *Journal of Stored Products Research*, 52, 78-85.
- Rao, N., Hanson, J., Dulloo, M., Ghosh, K., Nowell, D., y Larinde, M. (2007). Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma. *Biodiversity International* 8.

- Rao, N; Hanson, J; Dulloo, M; Ghosh, K; Nowell, D., y Larinde, M. (2007). *Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma*. Bioversity International 8.
- Reveles, L. y Velásquez, R. (2017). Patrimonio fitogenético: Banco de germoplasma de semillas ortodoxas del Campo Experimental Zacatecas. Folleto Técnico Núm 81.
- Rodríguez, I., Adam, G., y Durán, J. (2008). Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas. *Agricultura: Revista Agropecuaria* 912, 836-842.
- Rubio Rivas, O. S., y Navarro Velásquez, I. D. R. (2018). Efecto de tres niveles de sombra en el comportamiento fisiológico y vegetativo de cinco especies de leguminosas herbáceas, UCATSE 2017. (Tesis Doctoral, Universidad Católica del Trópico Seco). <http://repositorio.ucatse.edu.ni/12/1/D00282018.pdf>
- Ruiz, M. (2009). El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: cebadilla chaqueña. *EEA INTA Anguil Argentina*. 77, 1-19.
- Sanchez, A., Parra, M., Silva, M., y Pedroza-Pérez, D. (2011). Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre la viabilidad en semillas de zámota (*Coursetia glandulosa*, Gray). *Biotecnia*, 13(3), 36-40.
- Sánchez, N., y Jiménez, V. (2010). Técnicas de conservación in vitro para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía mesoamericana*, 21(1), 193-205.
- Schindelin, J., Arganda, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, JY., White, DJ., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., y Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-682.
- Silva, J., y Vieira, R. (2006) Avaliação do potencial fisiológico de sementes de beterraba. *Revista Brasileira de Sementes, Pelotas*, 28, 128-134.
- Solís, S., Gómez, M., y Velázquez, C. (2019). Viabilidad y germinación de semilla de *Cordia elaeagnoides* A. DC. *Polibotánica*, (48), 121-134.

- Soltani, A., Walter, K., Wiersma, A., Santiago, J., Quiqley, M., Chitwood, D., Porch, T., Miklas, P., McClean, P., Osorno, J., y Lowry, D. (2021). The genetics and physiology of seed dormancy, a crucial trait in common bean domestication. *BMC plant biology*, 21(1), 1-17.
- Souza, M. L., y Fagundes, M. (2014). Seed size as key factor in germination and seedling development of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *American Journal of Plant Sciences*, 5, 2566–2573
- Suárez, D., y Melgarejo, L. (2010). Biología y germinación de semillas. En L. M. Melgarejo (Ed.). Experimentos en fisiología vegetal. Editorial y ciudad. 13-249 p.
- Valerio, O., Vargas, G., y Barboza, L. (2020). Modelado de la cinética de hidratación del frijol Matambú (*Phaseolus vulgaris*) utilizando un sistema automático basado en análisis de imágenes digitales. *Revista Ingeniería*, 30(2), 63-76.
- Varela, S., y Arana, V. (2011). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. *Sistemas Forestales Integrados*, 3, 3-5.
- Vertucci, C., y Leopold, A. (1983). Dynamics of imbibition by soybean embryos. *Plant physiology*, 72(1), 190-193.
- Vindas Quesada, E. J. (2018). Determinación de calidad fisiológica de semillas de zanahoria (*Daucus carota* L.) mediante pruebas de vigor. [Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agrícola y de Biosistemas, Universidad de Costa Rica.].
- Wagner, M., Demilly, D., Ducournau, S., Dürr, C., y Léchappé, J. (2011). Computer vision for monitoring seed germination from dry state to young seedlings. *Seed Test* 142: 49-51.
- Yim, K., y Bradford, K. (1998). Callose deposition is responsible for apoplastic semipermeability of the endosperm envelope of muskmelon seeds. *Plant Physiology*, 118(1), 83-90.

10 . Anexos



Anexo 1. Molde acrílico con semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) colocadas en papel de germinación azul.



Anexo 2. Estante de madera cubierto con sarán verde (60% de luz), utilizado en pruebas de germinación.

Anexo 3. Resumen de las evaluaciones que se realizan en el ensayo de germinación de frijol:

Conteo	Días después de iniciado el ensayo	Variables evaluadas
1	5-7	-Plántulas normales -Semilla muerta
2	9-14	-Plántulas normales -Plántulas anormales -Semillas muertas -Semillas no germinadas

Elaborado por el Laboratorio de Análisis de Calidad de Semillas del CIGRAS.

Anexo 4. Cuadro comparativo de plántulas anormales y normales.

Plántulas normales	Plántulas anormales
1) Sistema de raíces bien desarrollado con una raíz primaria larga cubierta de numerosos pelos radicales y con presencia de raíces secundarias.	1) Plántulas dañadas. Plántulas con cualquiera de sus estructuras esenciales faltantes o severamente dañadas (más del 50%).
2) Hipocótilo y epicótilo elongados.	a. Raíz primaria ausente, severamente dañada y sólo una raíz secundaria poco desarrollada.
3) Dos cotiledones.	b. Plántulas con constricciones, con hendiduras, grietas o lesiones de las estructuras
4) Hojas primarias (2) bien desarrolladas.	
5) Presencia de una yema apical.	
6) Plántulas con defectos ligeros, siempre que manifiesten un desarrollo vigoroso	

y equilibrado de las otras estructuras esenciales:

- a. Plántulas con la raíz primaria dañada, pero con suficientes raíces secundarias bien desarrolladas.
- b. Plántulas con un retraso ligero en el crecimiento de la raíz primaria.
- c. Hipocótilo o epicótilo con daños leves (que no afecte tejidos conductores).
- d. Cotiledones con daño leve, si más de la mitad del tejido se encuentra en estado funcional y no hay evidencia de daño ni pudrición en el meristemo apical.
- e. Solo un cotiledón normal, si no existe evidencia de daño ni pudrición del meristemo apical.
- f. Cotiledones fusionados, siempre que más de la mitad del tejido se encuentre en estado funcional.
- g. Sólo una hoja primaria, si no existe evidencia de daño en meristemo apical.
- h. Hojas primarias con daños leves, si más de la mitad del tejido se encuentra en estado funcional.
- i. Hojas primarias bien desarrolladas pero con un tamaño

esenciales las cuales no son ni superficiales ni limitadas en extensión.

2) Plántulas deformadas. Plántulas con un desarrollo débil, cuyas estructuras esenciales son deformes o fuera de proporción.

- a. Hojas primarias atrofiadas, plántulas acuosas y vítreas (i.e., translúcidas), o en las que el desarrollo es muy limitado o muy desequilibrado.

3) Plántulas podridas. Plántulas con cualquiera de sus estructuras esenciales severamente enfermas o podridas (más del 50%) como resultado de una infección primaria (el foco de infección es la semilla de la cuál procede).

reducido (siempre que el tamaño sea mayor a un cuarto del tamaño de una hoja primaria de tamaño normal).

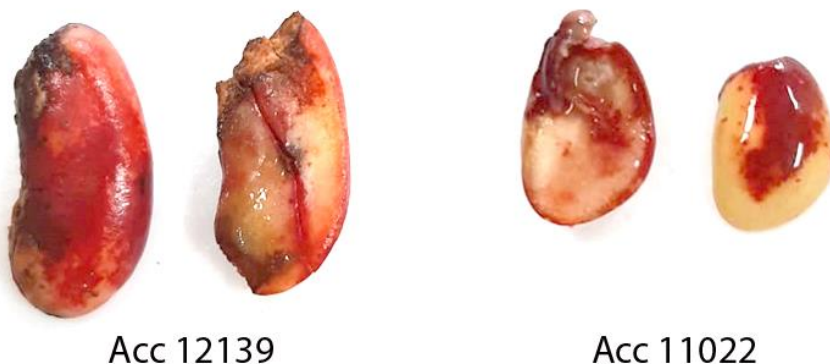
- j. Tres o más hojas primarias bien desarrolladas pero reducidas en tamaño (siempre que más de la mitad del tejido se encuentre en estado funcional).
- k. Plántulas superficialmente dañadas o con áreas podridas a nivel de órganos esenciales, pero en extensión limitada y sin que afecte los tejidos conductores.
- l. Plántulas severamente afectadas por hongos o bacterias, solamente si es evidente que la semilla no es el foco de infección y se puede determinar que todas las estructuras esenciales están presentes.

Elaborado por el Laboratorio de Análisis de Calidad de Semillas del CIGRAS.

Anexo 5. Cuadro comparativo entre semillas muertas y no germinada.

Semilla muerta	Semilla no germinada
Semilla que no presenta emergencia ni de radícula ni de hipocótilo y que, al ejercer presión con la pinza es posible aplastarla.	Semilla que no presenta emergencia ni de radícula ni de hipocótilo y que, al ejercer presión con la pinza NO es posible aplastarla.

Elaborado por el Laboratorio de Análisis de Calidad de Semillas del CIGRAS.



Anexo 6. Prueba de tetrazolio en semillas muertas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) pertenecientes a las accesiones provenientes del CIAT.