

Tratamientos de precondicionamiento en semillas de frijol para inducir tolerancia a *Fusarium oxysporum*

Pre-conditioning treatments in bean seeds for inducing tolerance to *Fusarium oxysporum*

Miguel Boñon Leyva, Lisi Cerna Rebaza y Julio Chico Ruiz

Laboratorio de Fitopatología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo-Perú, jchico22@gmail.com

RESUMEN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), considerado como una leguminosa de grano seco, presenta problemas de enfermedades producidas especialmente por hongos, de ahí que sea necesario buscar alternativas de tolerancia a los patógenos. La imprimación es un precondicionamiento de las semillas que, según la sustancia química que se utilice, muestra resultados favorables para tolerar los factores abióticos y bióticos. El objetivo fue demostrar que la imprimación de semillas, var. Caballero y var. Canario, induce tolerancia a *Fusarium oxysporum*. Se ensayaron con sales de CaCl_2 , CaSO_4 y NaCl a concentraciones de 25, 50 y 100 mM, respectivamente, en un diseño completamente al azar con tres repeticiones de 50 semillas cada una. Los resultados mostraron que la tolerancia es inducida por CaSO_4 a 100 mM con potencial germinativo del 82 % para var. Caballero y 92 % para var. Canario, seguido del CaCl_2 (100 mM) con un 80 % para var. Caballero y un 82 % para var. Canario, aplicando Tukey ($p < 0,05$), el CaSO_4 (100 mM), para ambas variedades, es estadísticamente el mejor inductor de tolerancia al ataque del patógeno. En conclusión, el CaSO_4 y CaCl_2 generan tolerancia a *F. oxysporum* en ambas variedades de frijol; no es recomendable utilizar el NaCl como agente imprimante.

Palabras claves: Osmocondicionamiento, *Phaseolus vulgaris*, germinación, *Fusarium oxysporum*.

ABSTRACT

Beans (*Phaseolus vulgaris* L.), considered as a dry grain legume, presents problems of diseases produced especially by fungi, for that reason it is necessary to look for alternatives of tolerance to the pathogens. The priming is a preconditioning of the seeds that, depending on the chemical used, shows favorable results to tolerate abiotic and biotic factors. The objective was to show that seed priming, var. Caballero and var. Canario, induces tolerance to *Fusarium oxysporum*. CaCl_2 , CaSO_4 and NaCl salts were tested at concentrations of 25, 50 and 100 mM respectively, in a completely randomized design with three replicates of 50 seeds each. The results showed that the tolerance is induced by CaSO_4 at 100 mM with germination potential of 82 % for var. Caballero and 92 % for var. Canario, followed by CaCl_2 (100 mM) with 80 % for var. Caballero and 82 % to var. Canario, applying Tukey ($p < 0.05$), CaSO_4 (100 mM), for both varieties, is statistically the best inducer of tolerance to the pathogen attack. In conclusion, CaSO_4 and CaCl_2 generate tolerance to *F. oxysporum* in both bean varieties, it is not advisable to use NaCl as a priming.

Key words: Osmo-conditioning, *Phaseolus vulgaris*, germination, *Fusarium oxysporum*.

INTRODUCCIÓN

La semilla es el gran promotor del crecimiento de la agricultura, pues de ella depende la productividad de los cultivos en un 15 a un 20 %; además, es deseable asegurar la uniformidad en la emergencia, mejorar y elevar la productividad del cultivo, y esta puede ser por medios físicos, mecánicos, químicos y fisiológicos (Rajjou *et al.*, 2012; Javid *et al.*, 2013).

Los plaguicidas, aparte de su eficacia, tienen la desventaja de dañar potencialmente el medioambiente y causar efectos secundarios sobre otras especies, además de la posible toxicidad humana. Esto permite

buscar opciones para enfrentar las plagas y enfermedades, pero que no permita contaminar el ambiente y al consumidor.

Una técnica que genera resistencia a factores abióticos y bióticos es la imprimación, la cual permite la regulación del contenido de agua en la semilla, ya sea por remojo en agua o en un soluto, en la cual las semillas absorben agua durante un intervalo de tiempo predefinido. Después de este intervalo, el proceso se detiene justo antes de que emerja la primera raíz. Según Shea-Campbel (2014), las semillas se imprimen por las

siguientes razones: a) disminuye el tiempo necesario para la germinación y emergencia; b) ayuda en la gestión de la producción y el aumento de uniformidad en la cosecha; c) amplía el rango de temperatura a la que una semilla puede germinar; d) aumenta la tasa de germinación a cualquier temperatura particular; e) reduce los tiempos de germinación en el campo en un 50 % a la posterior rehidratación; f) reduce en gran medida la cantidad de hongos y bacterias transmitidos por la semilla, generando resistencia.

La imprimación es rutinariamente utilizada en la industria de las flores, como *Petunia hybrida* L. (Di Girolano y Barbanti, 2012), hierbas como *Rosmarinus officinalis* L. y *Salvia splendens* L. (Di Girolano y Barbanti, 2012). En la mayoría de los casos, la producción comercial de semillas imprimadas son manejadas por compañías especializadas (Paparella *et al.*, 2015).

La imprimación osmótica, llamada también acondicionamiento osmótico u osmoacondicionamiento, consiste en el remojo de las semillas en soluciones que contienen nitrato de potasio (KNO_3), cloruro de potasio (KCl), polietilenglicol (PEG), cloruro de sodio (NaCl), manitol, etc. (Jisha *et al.*, 2012; Borges *et al.*, 2014; Paparella *et al.*, 2015), restringidos a contenidos de humedad predeterminados con potenciales hídricos entre $-0,5$ Mpa a $-2,0$ Mpa (Rajendra *et al.*, 2016 en Singh, 2014).

Encontramos evidencias de osmoacondicionamiento con la resistencia a la infección por *P. syringae* pv. *phaseolicola* inducida en frijol utilizando BABA e INA. Se evaluó la resistencia mediante la aparición de los síntomas, la acumulación del patógeno, cambios en la expresión de los genes de defensa, como cambios en los marcadores H3K4me3 y H3k36me3 asociados a los genes de defensa. Concluyeron que los genes de defensa son activadas por estas sustancias imprimantes (Martínez-Aguilar *et al.*, 2016). Farooq *et al.* (2005) utilizaron semillas de tomate osmoimprimadas con la finalidad de mejorar la germinación y vigor de la plántula. Las semillas fueron tratadas con $-1,1$ MPa de PEG 8000, NaCl y KNO_3 por 24 h. Todos los tratamientos proporcionaron mejores resultados con relación al testigo, pero fue el KNO_3 el que mejoró el vigor de plántula. Marín *et al.* (2007) evaluaron el efecto del acondicionamiento osmótico sobre la calidad fisiológica de semilla de cebolla después de cuatro períodos de almacenamiento. Se osmoacondicionaron con KNO_3 , KCl y PEG-8000 con cuatro potenciales osmóticos (-5 , -10 , -15 y -20 atm) durante 48, 72 y

96 h; las semillas fueron almacenadas a 10°C durante 0, 7, 90 y 180 días posteriores al acondicionamiento osmótico. Los resultados mostraron mayor vigor que en las plántulas del testigo no tratado. De los agentes de osmoacondicionamiento utilizados, el PEG-8000 a -5 atm durante 48 y 72 h permitió mayor calidad fisiológica de la semilla con relación a los demás tratamientos.

El frijol sigue siendo un cultivo vulnerable a una serie de enfermedades y plagas. La mayor parte de su producción a nivel mundial se presenta en los países de bajos recursos, como los pertenecientes a los del continente americano y africano. En el Perú es importante en el aspecto de sostenibilidad económica, social y ambiental. Actualmente representa un cultivo con posibilidades económicas en la población rural como una fuente importante de ocupación e ingreso, debido al potencial exportador de ciertas variedades, así como una garantía de seguridad alimentaria vía autoconsumo. El potencial de rendimiento en nuestro país alcanza los 3000 kg/ha a 4000 kg/ha, lo cual es muy bajo debido a una serie de factores que afectan directamente su producción, como la susceptibilidad a enfermedades causadas por virus, nemátodos y hongos (Valladolid y Voyset, 2006; González, 2008; Ministerio de Agricultura, 2010).

Los daños causados por los hongos patógenos que se desarrollan en semillas almacenadas causan una drástica reducción en el poder germinativo, ennegrecimiento total o parcial de las semillas, deterioran el embrión y producen rnicotoxinas, que pueden ser muy tóxicas para las personas y animales que las ingieren. Los géneros predominantes de hongos saprofitos asociados con semillas de frijol almacenadas son *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*. Su manifestación se hace notoria por la presencia del moho y un fuerte olor a enmohecido (Membreño *et al.*, 2001; Smith, 2012; Tekle *et al.*, 2012).

Con lo expuesto, el objetivo del trabajo fue demostrar que la imprimación de semillas de las vars. Caballero y Canario se induce tolerancia a *Fusarium oxysporum*. Se ensayaron con sales de CaCl_2 , CaSO_4 y NaCl a concentraciones de 25, 50 y 100 mM, respectivamente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas certificadas de *P. vulgaris* L. (frijol), de las variedades Caballero y Canario propor-

cionadas por la Estación Experimental Agraria Vista Florida-Chiclayo, Lambayeque (Perú).

Las muestras enfermas, fusariosis, procedieron del cultivo de frijol sembrado en la campiña de Moche, distrito de Trujillo-Perú. El patógeno se aisló de tejidos vegetales que presentaron síntomas típicos de la enfermedad: estrías longitudinales rojizas en el hipocotilo y en la raíz primaria de las plántulas. La muestra de tejido enfermo se envolvió en un papel toalla y luego se colocaron en bolsas de papel. Se determinó el huésped en el Herbarium Truxillensis (HUT) y se complementó la siguiente información: lugar donde se tomó la muestra (localidad, provincia, departamento, país), fecha de recolección de la muestra, nombre del recolector.

El aislamiento y monocultivo del patógeno se realizó en medio PDA (papa-dextrosa-agar), se hicieron varios aislamientos y siembras hasta obtener el monocultivo. Obtenidos estos se incubaron a 25 °C por veinte días hasta su crecimiento y madurez de los conidios. Se determinó la especie por observación microscópica del patógeno coloreado con azul de Aman y con auxilio de claves taxonómicas. La determinación se hizo hasta nivel de especie.

El proceso para obtener 1×10^6 conidios/mL se hizo siguiendo las indicaciones del manual publicado por CIAT (1990).

Las sales utilizadas fueron CaCl_2 , CaSO_4 y NaCl , todos ellos reactivos puros (marca Sigma), a concentracio-

nes de milimolares (mM). En la *Tabla 1* se indican la respectivas concentraciones y tratamientos.

Previo a la imprimación, las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2,5 % por 5 min y se enjuagaron tres veces con agua estéril para eliminar residuos del desinfectante. Luego fueron acondicionadas en un acuario (15 x 10 x 7 cm) con 50 mL de la sal respectiva, a una concentración determinada, durante 6 h, y aireadas con un motor pequeño de acuario. Posteriormente fueron lavadas con agua estéril tres veces, secadas con papel toalla y guardados por 24 h a temperatura ambiente en una bolsa de papel. Para el tratamiento testigo se utilizó agua estéril.

Las semillas imprimadas fueron expuestas al inóculo durante 6 h. Preparado la concentración del inóculo, se expusieron a las semillas en un sistema similar al utilizado con las sales. Transcurrido el tiempo fueron colocadas a germinar en placas Petri estériles de 15 cm de diámetro acondicionadas con papel filtro estéril y humedecidas con 30 mL de agua destilada estéril (*Fig. 1*).

A las 24 h, y durante cuatro días, se comenzaron a evaluar los siguientes parámetros germinativos: velocidad de germinación (*VG*, en días), potencia germinativa (*PG*, en porcentaje), tiempo medio de germinación (*TMG*, en días), índice de germinación (*IG*).

La presencia de 1 mm de radícula fue el criterio para la germinación. La potencia germinativa (*PG*) se registró con la siguiente fórmula:

$$PG = \left(\frac{\text{Número de semillas germinadas después de 4 días}}{\text{Número de semillas puestas a germinar}} \right) \times 100$$

La tasa media de germinación (*TMG*) fue determinada usando la fórmula descrita por Mohammadi (2009), donde *n* es el número de semillas y *D* es el número de días a partir del inicio del experimento:

$$TMG = \frac{\sum n}{\sum Dn}$$

Índice de germinación (*IG*) fue calculado con la siguiente fórmula (Atik *et al.*, 2007), donde *Gt* es el número de semillas germinadas en el día *t* y *Tt* es el número de días de germinación.

$$IG = \sum (Gt / Tt)$$

La velocidad de germinación (*VG*) fue calculada por la fórmula de Yari *et al.* (2010), donde *Ti* es el número de días después de iniciada la experiencia y *Ni* es el número de semillas germinadas en el día *i*.

$$VG = 100 \left[\frac{\sum Ni}{\sum TiNi} \right]$$



Figura 1. Semillas de *P. vulgaris* var. Caballero acondicionadas en placas Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada estéril y temperatura de 25 °C. Las semillas han sido previamente imprimadas (CaSO_4 , 100 mM) y expuestas al inóculo del patógeno. Se observa la emergencia de la radícula.

TABLA 1. Sales utilizadas para diseñar los tratamientos de imprimación en semillas de frijol, var. Caballero y Canario durante 6 h. A cada tratamiento le corresponde 50 semillas

Concentraciones (mM) Tratamientos	CaCl ₂	CaSO ₄	NaCl
T1	0	0	0
T2	25	25	25
T3	50	50	50
T4	100	100	50

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previo a la experiencia, las semillas fueron evaluados en su potencia germinativa; las dos variedades, a los ocho días, mostraron 100 % de germinación. En la experiencia, excepto NaCl, las sales utilizadas originan valores de germinación altos si los comparamos con los testigos (*Tablas 2 y 5*); entonces debemos aceptar la premisa de Wahid *et al.* (2008) sobre mejoras en el proceso germinativo que se asocia a síntesis de proteínas, mecanismos de reparación de membranas y disponibilidad de sustratos para la germinación; además, con los cambios en el metabolismo es posible que se re programe la expresión de los genes para la síntesis de antioxidantes.

El análisis de varianza (ANOVA) para *VG* y *TMG*, en ambas variedades, muestran diferencias estadísticamente significativas atribuibles a la solución utilizada, a la concentración e interacción de las mismas (*Tablas 2 y 5*). En la var. Canario la potencia germinativa (*PG*) e índice de germinación (*IG*) todos los efectos simples influyen en su germinación, es decir, solución, concentración y la interacción solución por concentración no presentan diferencias estadísticamente significativas. Por consiguiente, estos factores afectan de manera significativa en la germinación (*Tabla 5*).

Efecto de las soluciones

En la comparación de rangos múltiples de soluciones para los parámetros evaluados por la prueba Tukey ($p < 0,05$), para la var. Caballero (*Tablas 2 y 3*), se encontró que las diferentes concentraciones de CaCl₂ (25, 50 y 100 mM) muestran valores altos para *VG* (0,82-0,84 y 0,89, respectivamente), pero esta no es diferente estadísticamente al resultado mostrado por NaCl (0,79-0,84 y 0,87), pero sí con CaSO₄ (0,74-0,76 y 0,77), quien muestra valores bajos con relación a las otras soluciones. En lo que respecta a *PG* (76,66-80,66 y 88 %) e *IG* (1,04-1,11 y 1,15), con CaSO₄ se encontró valores altos con relación al CaCl₂ y NaCl y

los valores más bajos para *TMG* (0,88-0,87 y 0,90, respectivamente). Esto indica que estadísticamente la mejor solución para realizar el acondicionamiento osmótico es el CaSO₄ (*Tabla 4*). Para la var. Canario (*Tablas 5 y 6*), cuando se imprima con CaCl₂ (25, 50 y 100 mM), *VG* (0,87-0,87 y 0,90, respectivamente), muestra valores superiores con respecto a las soluciones de CaSO₄ y NaCl, y estos no son estadísticamente diferentes. Además, los valores altos observado en *PG* (86,66-91,33 y 95,33 %) e *IG* (1,01-1,13 y 1,12) se consiguió con el CaSO₄, y a la vez esta solución mostró efectos menores para *TMG* (0,89-0,81 y 0,94) con relación a las otras dos sales de imprimación, lo que indica que el sulfato de calcio es la mejor para inducir tolerancia a *F. oxysporum*, en tanto los valores más bajos para *VG*, *PG* e *IG* se observaron para la solución de NaCl. Entonces *VG* y *PG* va aumentando según aumenta la concentración de la sales para CaSO₄ y CaCl₂ (*Tablas 2 y 5*).

Efecto de las concentraciones

La prueba de rangos múltiples para concentración (*Tabla 4*, var. Caballero) mostró los mejores resultados para *VG* (CaCl₂: 0,89; CaSO₄: 0,77; NaCl: 0,87) a 100 mM; pero los tres niveles de concentración no son diferentes estadísticamente con respecto al control 0 Mm (0,80; 0,69 y 0,76, respectivamente); entonces, al utilizar cualquiera de las concentraciones, los resultados fueron similares. Para *PG* tenemos tres grupos distintos. En 50 mM y 100 mM observamos el mismo valor máximo, con respecto al control (0 mM), que a su vez presentó el valor más bajo para este parámetro, así como para *TMG*, en el cual se observa la formación de un solo grupo estadístico; por consiguiente, no hay una diferencia estadística marcada entre los tres niveles de molaridad respecto al control (0 mM). Entonces, con cualquiera de los tres niveles de concentración utilizados se obtendrá el mismo resultado para este parámetro estadístico. Con respecto al *IG*, el mayor índice se registró a 50 mM, pero este no es diferente estadísticamente a 25 y 100 mM.

En consecuencia, al utilizar cualquiera de las tres concentraciones, los resultados para este parámetro serán similares estadísticamente. Al analizar los resultados de la var. Canario (Tabla 7), dentro de los parámetros *VG* y *TMG*, únicamente se forman un solo grupo de medias, lo que indica que estos valores son estadísticamente iguales, es decir, da lo mismo utilizar cualquiera de las milimolaridades (25, 50 o 100 mM) para acondicionarlas osmóticamente en el proceso de germinación. Igual análisis se obtiene para *PG* e *IG*; por lo tanto, cualquiera de las tres concentraciones utilizadas tendrán el mismo efecto al momento de evaluarlas.

Los valores altos de germinación (*PG*) en el caso de semillas imprimadas con soluciones inorgánicas, podría ser debido a la mejora en los procesos bioquímicos imperativos para la germinación, o también debido al aumento de la tasa de división celular en las puntas de las raíces de plántulas de semillas imprimadas, como se informó en tomate (Farooq *et al.*, 2005) y melón (Sivritepe *et al.*, 2003). Además, se conoce que *PG* indica un óptimo soporte de las semillas en comparación con los que tienen valores más bajos de germinación. Ello se confirma con CaSO_4 , ya que los estadísticos confirman a esta sal como la mejor inductora de resistencia (Tablas 2, 4, 5 y 7).

También se observa una relación entre *TMG* y *PG* (Tablas 2 y 5), que según Farooq *et al.* (2006a), las semillas imprimadas completan el proceso de germinación en un corto tiempo debido a los nutrientes disponibles durante la germinación. En las semillas no germinadas correspondiente en su mayoría al tratamiento con NaCl (100 mM, Tablas 2 y 5), según Bybordi y Tabatabaei (2009) esto se asocia con la disminución de la absorción de agua en las semillas y susceptibilidad al ataque del patógeno, observándose descomposición de la misma y la aparición de micelio blanco-cremoso sobre ella (Fig. 2), cuyo posteriormente aislamiento y cultivo determinó la presencia de *F. oxysporum*.

Para ambas variedades de frijol estudiadas, el tratamiento con CaSO_4 muestra el mayor valor para *IG*, este último con diferencias significativas respecto a las otras dos soluciones, quienes presentan un bajo *IG* y *PG* y elevado invasión del patógeno sobre la semilla; según Onesironsan, citado por Smith (2012), encontró una relación directa del índice de la invasión de hongos con la disminución del índice de germinación de las semillas (Tabla 5).



Figura 2. En general las semillas lograron germinar, pero, si no mostraban tolerancia al patógeno la raíz no crecía y rápidamente se veían cubiertas por el micelio blanco del hongo. Testigo (*T1*) con NaCl.

La presencia de Ca^{2+} en la solución osmoimprimante ayuda a mejorar el estado del agua en la célula, reduciendo el Na^+ y favoreciendo la absorción de K^+ (Ashraf *et al.*, 2003) y actúa como cofactor en la actividad de numerosas enzimas, la mayoría de las cuales son activas cuando la reserva se moviliza, cuando la protrusión de la raíz está en progreso (Farooq *et al.*, 2006a) o cambia los patrones de homeostasis para el nitrógeno y el calcio en la semilla y plántula, respectivamente, los cuales están asociados en mejorar la actividad de la α -amilasa y reducir los contenidos de azúcares (Farooq *et al.*, 2006b).

Entonces, demostrado estadísticamente que el CaSO_4 fue la mejor sal osmoimprimante, se repitió la misma experiencia; pero evaluando el crecimiento de la plántula, se encontraron los mismos resultados de inducción de tolerancia a *F. oxysporum* (datos no mostrados).

Efecto del NaCl

Goykovic y Saavedra (2007) y Farooq (2005) explicaron que la probabilidad en el retraso al ingreso de agua debido a los solutos sea la causa del mayor *TMG* registrado; además, mencionan que mayor tiempo transcurrido desde el comienzo de la imbibición hasta la protrusión radicular pudo haber hecho factible que se produjeran cambios adaptativos. Estos cambios habrían permitido que se afectaran la potencia germinativa, así como el índice de germinación, quienes reportaron que durante la fase de germinación de las semillas de tomate, el NaCl hace que se reduzca esta fase en mayor o menor medida, dependiendo de la

concentración con la que tratemos, además de hacer que las semillas tengan más días para germinar. La reducción en el porcentaje de germinación puede explicarse por el aumento de la presión osmótica externa que afecta a la absorción de agua por la semilla, y puede ser también debido a la acumulación de iones de Na⁺ y Cl⁻ en el embrión, lo que puede conducir a

una alteración en el metabolismo de los procesos de germinación, toxicidad e incluso causar la muerte de células en el embrión (Khajeh-Hosseini *et al.*, 2003; Rajendra *et al.*, 2016), o algunos trastornos de los procesos fisiológicos, como los compuestos fenólicos, que se ve reflejado en la reducción de la germinación final (Jamil *et al.*, 2006; Borges *et al.*, 2014).

Tabla 2. Promedios de los parámetros de germinación de las semillas de *P. vulgaris* L., frijol, var. caballero para los tratamientos de CaCl₂, CaSO₄ y NaCl a concentraciones de 0 mM, 25 mM, 50 mM y 100 mM, expuestos a *F. oxysporum*

Tratamientos (mM)	CaCl ₂				CaSO ₄				NaCl			
Parámetros de germinación	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
VG	0,80	0,82	0,84	0,89	0,69	0,74	0,76	0,77	0,76	0,79	0,84	0,87
PG	42	61	80	82	41,33	76,66	80,66	88	40,33	38,66	37,33	28
TMG	0,92	0,93	0,91	0,96	0,79	0,88	0,87	0,90	0,93	0,95	0,96	0,92
IG	0,55	0,71	0,95	0,93	0,56	1,04	1,11	1,15	0,48	0,45	0,40	0,33

VG: Velocidad de germinación (días), PG: Potencia germinativa (%), TMG: Tiempo medio de germinación (días), IG: Índice de germinación. Los promedios son resultados de tres repeticiones.

TABLA 3 . Prueba de rangos múltiples de soluciones, para los parámetros germinativos de *P. vulgaris* L. var. caballero

Comparaciones múltiples (Tukey HSD)				
Solución	Parámetros germinativos			
	VG	PG	TMG	IG
NaCl	0,83a	36,08a	0,930833a	0,428a
CaCl ₂	0,84a	66,25b	0,930833a	0,785b
CaSO ₄	0,74b	71,66 c	0,861667b	0,966c

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

TABLA 4. Prueba de rangos múltiples de concentraciones, para los parámetros germinativos de *P. vulgaris* L. var. Caballero

Comparaciones múltiples (tukey hsd)				
Concentración (mM)	Parámetros germinativos			
	VG	PG	TMG	IG
0	0,75a	41,22 a	0,86 a	0,526667 a
25	0,81a	58,77 b	0,91 a	0,751111 b
50	0,81a	66,00 c	0,92 a	0,824444 b
100	0,84a	66,00 c	0,92 a	0,804444 b

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 5. Promedios de los parámetros de germinación de las semillas de *P. vulgaris* L. var. Canario para los tratamientos de CaCl₂, CaSO₄ y NaCl a concentraciones de 0 mM, 25 mM, 50 mM y 100 mM, expuestos a *F. oxysporum*

Tratamientos (mM)	CaCl ₂				CaSO ₄				NaCl			
Parámetros de germinación	0	25	50	100	0	25	50	100	0	25	50	100
VG	0,82	0,87	0,87	0,90	0,76	0,77	0,80	0,86	0,73	0,75	0,76	0,79
PG	46,67	73,33	78	84,67	41,33	86,66	91,33	95,33	46	44	40	34
TMG	0,93	0,94	0,95	0,96	0,88	0,89	0,81	0,94	0,89	0,87	0,90	0,89
IG	0,57	0,84	0,89	0,97	0,56	1,01	1,13	1,12	0,62	0,61	0,50	0,43

VG: Velocidad de germinación (días), PG: Potencia germinativa (porcentaje), TMG: Tiempo medio de germinación (días), IG: Índice de germinación. Los promedios son productos de tres repeticiones.

Tabla 6. Prueba de rangos múltiples de soluciones, para los parámetros germinativos de *P. vulgaris* L. var. Canario

Comparaciones múltiples (Tukey HSD)				
Solución	Parámetros germinativos			
	VG	PG	TMG	IG
NaCl	0,75 a	41,00 a	0,890833 ab	0,54 a
CaCl ₂	0,86 b	70,66 b	0,948333 b	0,82 b
CaSO ₄	0,79 a	78,66 c	0,883333 a	0,95 c

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 7. Prueba de rangos múltiples de concentraciones para los parámetros germinativos de *P. vulgaris* L. var. Canario

Comparaciones múltiples (tukey hsd)				
Concentración (mm)	Parámetros germinativos			
	VG	PG	TMG	IG
0	0,771111 a	44,66 a	0,90 a	0,58 a
25	0,811111 a	68,00 b	0,90 a	0,82 b
50	0,808889 a	69,77 b	0,89 a	0,84 b
100	0,828889 a	71,33 b	0,93 a	0,84 b

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES

- El tratamiento con CaSO₄, a una concentración de 100 mM, es el mejor de los tratamientos utilizados

en ambas variedades de frijol, generando los más altos valores de porcentaje de germinación y otros parámetros de germinación.

- Los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron con la var. Canario, 92 %, para el tratamiento con CaSO_4 , 100 mM, y con el mismo tratamiento en la var. Caballero se obtuvo 82 % de germinación.
- Las semillas de frijol Caballero y Canario imprimadas con CaCl_2 , 100 mM mostraron un porcentaje de germinación del 82 y 80 %, respectivamente, mayor que las semillas tratadas con NaCl , 100 mM.
- Las pruebas estadísticas recomienda utilizar el CaSO_4 a cualquier concentración en el proceso de imprimación, entonces utilizar la de 25 mM.

Agradecimientos

Al profesor Manuel Rodríguez Lacherre, integrante de la cátedra de Fitopatología de la Universidad Nacional de Trujillo, por la lectura y sugerencias al documento.

Al vicerrectorado de Investigación, Universidad Nacional de Trujillo-Perú, quién apoyó mediante el fondo de financiamiento PICFEDU-2016.

REFERENCIAS

- Ashraf, M.; A. Kausar; M.Y. Ashraf. Alleviation of salt stress in pearl millet through seed treatments. *Agronomie* 23, 227-234. French. 2003.
- Atik M.; O. Karagüzel; S. Ersoy. Effect of temperature on germination characteristics of *Dalbergia sissoo* seeds. *J. Faculty Agric.*, Akdeniz University, 20: 203-210. Finlandia. 2007.
- Borges, A.; D. Jiménez-Arias; M. Expósito-Rodríguez; L. Sandalio; J. Pérez. Priming crops against biotic and abiotic stresses: MSB as a tool for studying mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 5:1-4. USA. 2014.
- Bybordi A.; J. Tabatabaei. Effect of salinity stress on germination and seedling properties in canola cultivars (*Brassica napus* L.). *Bot Hort Agrobot*, 37(2): 71-76. Italy. 2009.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Manejo del hongo en el laboratorio. *Fusarium oxysporum*. Enfermedad: Amarillamiento por *Fusarium*. En: Informe Anual: CIAT. Cali, Colombia. 1990.
- Di Girolamo, G.; L. Barbanti. Treatment conditions and biochemical processes influencing seed priming effectiveness, *Italian J Agr.* 7:25. Italia. 2012.
- Farooq, M.; S. Basra; B. Saleem; M. Nafees; S. Chishti. Enhancement of tomato seed germination and seedling vigour by osmopriming, *Pak. J. Agric. Sci.* 42(3-4): 36-41. Pakistán. 2005.
- Farooq, M.; S.M.A. Basra; A. Wahid. Priming of field-sown rice seed enhances germination, seedling establishment, allometry and yield, *Plant Growth Regulation* 49: 285-294. USA. 2006a.
- Farooq, M.; S.M.A. Basra; K. Hafeez. Seed invigoration by osmohardening in fineand course rice, *Seed Sci Technol.* 34:181-186. USA. 2006b.
- González, L. Evaluación de la diversidad genética en una colección de germoplasma de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de Ruanda (África). [Tesis]. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia. 2008.
- Goykovic, V.; G. Saavedra del Real. Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo, *IDESIA* 25(3): 47-78. Chile. 2007.
- Heydecker, W.; P. Coolbear. Seed treatments for improved performance-survey and attempted prognosis, *Seed Sci. Tech.* 5:353-425. USA. 1977.
- Jamil, M.; M. Majid; M.A. Rasoo. Ratooning performance of different sugarcane varieties, Proceedings of 41th Annual Convention of Pakistan Society of Sugar Technologists held at Rawalpindi on August 21-22. Pakistán. 2006.
- Javid, N.; H Muhammad; J Abdul; A Ghulam; S. Muhammad; S Mashoodul; S.H. Imran. Seed priming a technique, *J Agri Crop Sci.* 6 (20): 1373-1381. England. 2013.
- Jisha, K.; K. Vijayakumari; J. Puthur. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview, *Acta Physiol Plant*, 35(5): 1381-1396. USA. 2012.
- Jisha, K.C.; K. Vijayakumari; J.T. Puthur. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview, *Acta Physiol Plant* 35:1381-1396. USA. 2013.
- Khajeh-Hosseini, M.; A.A. Powell; I.J. Bingham. The interaction between salinity stress and seed vigour during germination of soyabean seeds, *Seed Sci Technol* 31:715-725. USA. 2003.
- Marín Sánchez, J.; J.A. Mejía Contreras; A. Hernández Livera; A. Carballo; A. Peña Lomelí. Acondicionamiento osmótico de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.), *Agric. Téc. Méx.* 33(1): 63-71. México. 2007.
- Martínez-Aguilar, K.; G. Ramírez-Carrasco; J.L. Hernández-Chávez; A Barraza; R. Álvarez-Venegas. Use of BABA and INA as activators of a primed state in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Frontiers in Plant Science* 7: 65. USA. 2016.
- Membreño, J.; M. Zapata; J. Beaver; R. Smith. Microflora en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), *Agronomía Mesoamericana*, 12(2):135-139. Costa Rica. 2001.
- Ministerio de Agricultura-DGPA. Plan estratégico de la cadena productiva de menestras [Boletín online]. Perú; 2010. [Consultado 20 agosto 2014]. Disponible en: <http://www.planeamientoygestion.com.pe/consultoria/images/stories/herramientas/documentos/menestras.pdf>. 2010.
- Mohammadi, G.R. The effect of seed priming on plant traits of late spring seeded soybean (*Glycine max* L.), *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 5: 322-326. USA. 2009.
- Paparella, S.; S.S. Araújo; G. Rossi; M. Wijayasinghe; D. Carbonera; A. Balestrazzi. Seed priming: state of the art and new perspectives, *Plant Cell Rep* 34:1281-1293. USA. 2015.
- Rajendra Prasad, S.; R. Umesh; K.V. Kamble; K. Sripathy; K. Udaya Bhaskar; D. P. Singh Seed Bio-priming for Biotic and Abiotic Stress Management D.P. Singh et al. (eds.), *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. 2016.
- Rajjou, L.; M. Duval; K. Gallardo; J. Catusse; J. Bally; C. Job; D. Job. Seed germination and vigor, *Annu Rev Plant Biol* 63:507-533. USA. 2012.
- Shea-Campbel, J.: Communications. Seed Dynamics: The Seed Preparation Professionals. [Homepage en internet], [Citado 19 agosto 2014]. Disponible en : <http://seeddynamics.com/seedtechnology/techniques/priming/> 2014.
- Sivritepe, N.; H. Sivritepe; A. Eris. The effect of NaCl priming on salt tolerance in melon seedling grown under saline condition, *Sci. Hort.* 97: 229-237. USA. 2003.
- Smith, J. Reducción de las pérdidas de frejol seco almacenado del pequeño agricultor en la sierra ecuatoriana, Santa Catalina [libro electrónico]. California: Google Play; [Consultado: 21 de agosto 2014]. Disponible en: <http://books.google.com.pe/books?id=020zAQAAMAA-J&lpg=PP1&hl=es&pg=PP1#v=onepage&q&f=true>. 2012.
- Tekle, S.; H. Skinnnes; A. Bjørnstad. The germination problem of oat seed lots affected by *Fusarium* head blight, *Eur J Plant Pathol* 133(3): 499-505. Netherlands. 2012.
- Valladolid, A.; O. Voysest. Clases comerciales de leguminosas de grano. Catálogo para orientar la comercialización en los mercados nacionales e internacionales. PROMENESTRAS TEX-Chiclayo-Perú. 250 p. 2006.
- Wahid, A.; A. Noreen; S. Basra; S. Gelani; M. Farooq. Priming-induced metabolic changes in sunflower (*Helianthus annuus*) achenes improve germination and seedling growth, *Botanical Studies* 49: 343-350. Sinica. 2008.
- Yari L.; M. Aghaalikani; F. Khzaei. Effect of seed priming duration and temperature on seed germination behavior of bread wheat (*Triticum aestivum* L.), *ARPN J. Agric. Biol. Sci.* 5: 5-8. USA. 2010.