



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SEMILLAS
GERMINADAS Y NO GERMINADAS DE LEGUMINOSAS
SILVESTRES**

BEATRIZ GARDUZA ACOSTA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2016

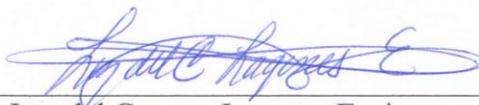
La presente tesis titulada “**Cambios en la actividad enzimática en semillas geminadas y no germinadas de leguminosas silvestres**”, realizada por la alumna Beatriz Garduza Acosta, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

Consejera:



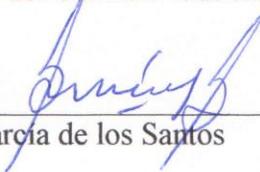
Dra. Luz del Carmen Lagunes Espinoza

Asesora:



Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz

Asesor:



Dr. Gabino García de los Santos

Asesor:



Dr. Juan Manuel Zaldívar Cruz

H. Cárdenas, Tabasco. 07 de abril de 2016.

CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN SEMILLAS GERMINADAS Y NO GERMINADAS DE LEGUMINOSAS SILVESTRES

Beatriz Garduza Acosta
Colegio de Postgraduados, 2016

Se estudió el efecto de regímenes de temperatura y tratamiento pre-germinativos sobre el porcentaje (PG), velocidad (VG) de germinación y actividad enzimática de β -glucosidasa, α -D-galactosidasa, β -1,3-glucanasa y α -amilasa de *Crotalaria longirostrata* y *Lupinus exaltatus*. Semillas maduras de ambas especies se recolectaron en la región de los Valles y Libres del Serdán, Puebla (*L. exaltatus*) y en Macuspana, Tabasco (*C. longirostrata*). El régimen de temperatura mostró un efecto altamente significativo en el PG y actividad de α -D-galactosidasa en ambas especies, y no se detectó actividad de α -amilasa y β -1,3-glucanasa. En *L. exaltatus*, el mayor PG y VG se presentó en el régimen de 25 °C/25 °C con 25.92 % y 0.68 semillas día⁻¹; y en *C. longirostrata* en el régimen de 30 °C/20 °C con 6.11 % y 0.20 semillas día⁻¹. En esta especie, la mayor actividad de α -D-galactosidasa se observó en el régimen 7 días a 5 °C seguido de 20 °C/20 °C (10 547.5 U/mg proteína total); y en β -glucosidasa en el régimen de 20 °C/15 °C (215.6 U/mg de proteína total). En *C. longirostrata*, la mayor actividad, ambas enzimas, se presentó en el régimen de 20 °C/15 °C; 16 162.3 U/mg proteína total y 539.3 U/mg de proteína total de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa, respectivamente. Los tratamientos pre-germinativos con H₂SO₄ al 98 % por 15 min y H₂O a 80 °C por 1 min incrementaron la absorción de agua, PG y VG en *L. exaltatus* y *C. longirostrata*, respectivamente. A las 120 h después de siembra, las semillas de *L. exaltatus* alcanzaron un PG y VG de 30.95 % y 0.07 semillas h⁻¹, respectivamente; las de *C. longirostrata* de 55.56 % y 0.19 semillas h⁻¹. En ambas especies, la actividad de la α -D-galactosidasa fue siempre mayor en semillas enteras y las de α -amilasa y β -1,3-glucanasa fueron extremadamente bajas en ambas especies (< 0.1 U/mg de proteína total). Después de la aplicación del tratamiento pre-germinativo donde se presentó el mayor PG, también se observó la mayor actividad de α -D-galactosidasa. En *C. longirostrata*, fue a las 72 h en el tratamiento de H₂O 80 °C 1 min (82 624.2 U/mg de proteína total) y en *L. exaltatus* a las 36 h en el tratamiento H₂SO₄, 98 % 15 min (9 521.3 U/mg de proteína total). En contraste, no se observó relación entre actividad de β -glucosidasa y PG. La mayor actividad de esta enzima se observó a la hora 0 en *C. longirostrata* (tratamiento H₂SO₄, 98 % 15 min con 511.3 U/mg de proteína total), mientras que en *L. exaltatus* se presentó en el tratamiento de 35 °C/25 °C (172.1 U/mg de proteína total).

Palabras claves: Régimen de temperatura, tratamiento pre-germinativo, germinación, α -D-galactosidasa, β -glucosidasa.

CHANGES IN ENZYME ACTIVITY OF GERMINATED AND UNGERMINATED SEEDS OF WILD LEGUMES

Beatriz Garduza Acosta
Colegio de Postgraduados, 2016

The effect of temperature regime and pre-germinative treatments were studied on the percentage (GP), speed (GS) of germination and enzyme activity of β -glucosidase, α -D-galactosidase, β -1,3-glucanase and α -amylase in *Lupinus exaltatus* and *Crotalaria longirostrata*. Dry seeds of both species were collected in the region of Valles del Serdán and Libres, Puebla (*L. exaltatus*) and Macuspana, Tabasco (*C. longirostrata*). The temperature regime showed a highly significant effect on the PG and activity of α -D-galactosidase in both species. No α -amylase y β -1,3-glucanase enzyme activity was detected. In *L. exaltatus*, the highest GP and GS was observed in the regime of 25 °C/25 °C with 25.92 % and 0.68 seeds days⁻¹ and *C. longirostrata* in the regime of 30 °C/20 °C with 6.11 % and 0.20 seeds day⁻¹. In this specie, an increase of α -D-galactosidase activity was observed in the regime 7 days at 5 °C followed by 20 °C/20 °C (10 547.5 U/mg total protein); and β -glucosidase in the regime of 20 °C/15 °C (215.6 U/mg total protein). In *C. longirostrata*, the highest activity, both enzymes, was observed in the regime of 20 °C/15 °C; 16 162.3 U/mg total protein (α -D-galactosidase) and 539.3 U/mg total protein (β -glucosidase). The pre-germinative treatment 15 min with 98 % H₂SO₄ and H₂O at 80 °C for 1 min increased water absorption, GP and SG and enzyme activity. At 120 h after seeding, the *L. exaltatus* seeds reached 30.95 % of GP and a SG of 0.07 seeds h⁻¹; 55.56 % and 0.19 seeds h⁻¹ for *C. longirostrata*. In both species, the activity of the α -D-galactosidase was higher in the dry seeds and of α -amylase and β -1,3-glucanase were extremely low (< 0.1 U/mg total protein). After application of the pre-germinative treatment that increased GP significantly, a higher α -D-galactosidase activity was also observed. In *C. longirostrata*, was 72 h after seeding in H₂O 80 °C 1 min treatment (82 624.2 U/mg total protein) and in *L. exaltatus* at 36 h in H₂SO₄ 98 % 15 min treatment (9 521.3 U/mg total protein). In contrast, no relationship was observed between β -glucosidase activity and GP in both species. Increased activity of this enzyme was observed at time 0 in *C. longirostrata* (H₂SO₄ 98 % 15 min, 511.3 U/mg total protein), whereas in *L. exaltatus* was at the treatment 35 °C/25 °C (172.1 U/mg total protein).

Key words: Temperature regime, pre-germinative treatment, germination, α -D-galactosidase, β -glucosidase.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT): Por la beca otorgada para realizar mis estudios de postgrado en maestría en ciencias.

Al Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco: Por abrirme sus puertas y por los conocimientos aportados de cada profesor para mi formación académica.

A la Dra. Luz del Carmen Lagunes Espinoza: Por darme la oportunidad de ser su estudiante y ayudarme en el trabajo de investigación de tesis. Por enseñarme que la organización es la clave para que todo salga bien. Muchas gracias por ser dedicada con sus estudiantes. Bendiciones.

A la Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz: Por ayudarme con la estandarización de técnicas para realizar los análisis enzimáticos. Gracias porque el tiempo invertido en cada estudiante no es en vano, al final siempre se obtienen frutos.

A la Dra. Adriana Delgado Alvarado (*Campus* Puebla): Por ser un ejemplo de superación y enseñarme que todo se puede lograr cuando se tiene el esmero de seguir adelante. También, por impartirme el curso de enzimología.

Al Dr. Juan Manuel Zaldívar Cruz: Por ayudarme a buscar información y a revisar el presente trabajo. Por enseñarme que todo tiene su tiempo y que no hay razón por la cual estresarse.

Al Dr. Gabino García de los Santos (*Campus* Montecillo): Por formar parte de mi consejo particular y también por ayudarme a mejorar el presente trabajo de investigación.

A mis amigos y compañeros: Alejandro, Berenice, Blanca, Darío, Edna, Eduardo, Félix, Hitzell, Juan Carlos, Lenin, Lety, Magín, Mary, Nimide, Noemí, Omar, Rebeca, Rica, Sofía, Wander, Yansi y Zayded. Muchas gracias a los que me ayudaron en el trabajo de tesis. Gracias a Dios porque me tocó conocerlos en esta etapa.

A Hitzell Córdova López y Rebeca Rodríguez Falconi: Por su compañía en el Laboratorio de Fisiología Vegetal durante la evaluación de algunos tratamientos.

A Magín González Moscoso: Por haber dedicado tiempo para ayudarme y acompañarme en algunas etapas de la investigación de tesis. Bendiciones.

Al Dr. Adolfo Bucio Galindo: Por estar siempre disponible y por prestarme material. Muchas gracias por las buenas vibras. Bendiciones.

A Celia, Deyanira, Liz, Elsi, Verónica y Anita: Por su ayuda en los trámites académicos de la maestría. Gracias por su amabilidad.

A todos los que han sido mis maestros y han compartido sus conocimientos. Muchas bendiciones.

A todos los que ayudaron en la realización de este trabajo, muchas gracias, por dedicar su tiempo y esfuerzo.

“Desarrolla una actitud de gratitud y da las gracias por todo lo que te sucede, sabiendo que cada paso adelante es un paso hacia el logro de algo más grande y mejor que tu situación actual”.

Brian Tracy.

DEDICATORIA

A mí amado Dios:

Por sostenerme en cada paso de mi vida.

“Porque yo Jehová soy tu Dios, quien te sostiene de tu mano derecha, y te dice: No temas, yo te ayudo” Isaías 41: 13.

A mis padres:

Por su apoyo en cada una de mis decisiones.

A mis hermanos:

Por su ayuda y comprensión en cada etapa de mí desarrollo profesional.

A mis amigos:

Por compartir sus experiencias y conocimientos.

A mis abuelitos:

Por ser una de mis fuentes de inspiración.

A mis sobrinos:

Por darle un toque de alegría a cada día durante la maestría.

El presente trabajo de investigación se realizó con el financiamiento otorgado a través del proyecto de Ciencia básica CONACYT con clave CB-2012-01 181428 y, al apoyo de investigación otorgado por el Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco al proyecto clave 449 registrado en su matriz de investigación.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Introducción general.....	1
1.2. Objetivos	4
1.3. Hipótesis.....	4
1.4. Literatura citada.....	5
CAPÍTULO II	8
REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1. Importancia de las fabáceas en la alimentación	8
2.1.1. El género <i>Lupinus</i>	9
2.1.2. El género <i>Crotalaria</i>	10
2.2. El proceso de germinación	11
2.2.1. El rol de las enzimas durante las etapas de germinación	12
Imbibición de agua	12
Síntesis y activación de sistemas enzimáticos.....	12
Degradación de las sustancias de reserva (carbohidratos)	13
Elongación de las células del embrión y emergencia de la radícula	14
2.2.2. Control de la germinación	17
2.3. Latencia, su papel biológico e implicaciones.....	17
2.3.1. Clasificación de la latencia.....	18
2.3.2. Mecanismos para liberar la latencia	19
2.4. Implicaciones de la testa en la latencia	20
2.4.1. Enzimas que degradan la testa de las semillas	23
2.5. Literatura citada.....	24
CAPÍTULO III	34
EFEECTO DE LA TEMPERATURA EN EL PORCENTAJE, VELOCIDAD DE GERMINACIÓN Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SEMILLAS DE <i>Crotalaria longirostrata</i> Y <i>Lupinus exaltatus</i>	34
3.1. RESUMEN	34
3.2. INTRODUCCIÓN	35
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.3.1. Material biológico	37
3.3.2. Desinfección de semillas.....	37
3.3.3. Prueba de viabilidad.....	37
3.3.4. Regímenes de temperatura de germinación	37
3.3.5. Determinación del porcentaje y velocidad de germinación	38

3.3.6. Determinación de la actividad enzimática de β -glucosidasa, α -D-galactosidasa, β -1,3-glucanasa y α -amilasa.....	38
3.3.6.1. Obtención del extracto crudo enzimático a partir de polvos secos de acetona	38
3.3.6.2. Obtención del extracto crudo enzimático con regulador de acetato de sodio	39
3.3.7. Actividad enzimática de β -glucosidasa	39
3.3.8. Actividad enzimática de α -D-galactosidasa	40
3.3.9. Actividad enzimática de β -1,3-glucanasa	40
3.3.10. Actividad enzimática de α -amilasa	41
3.3.11. Proteína total	41
3.3.12. Azúcares reductores	42
3.3.13. Análisis estadístico.....	42
3.4. RESULTADOS	43
3.4.1. Porcentaje y velocidad de germinación.....	43
3.4.2. Efecto de los regímenes de temperatura sobre la actividad enzimática específica de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa	46
3.5. DISCUSIÓN	50
3.5.1. Efecto de la temperatura sobre el porcentaje y velocidad de germinación	50
3.5.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática específica	51
3.6. CONCLUSIONES.....	52
3.7. LITERATURA CITADA	53
CAPÍTULO IV	59
EFFECTO DE TRATAMIENTOS PRE-GERMINATIVOS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE β-GLUCOSIDASA Y α-D-GALACTOSIDASA DURANTE LA GERMINACIÓN DE <i>L. exaltatus</i> Y <i>C. longirostrata</i>.....	59
4.1. RESUMEN.....	59
4.2. INTRODUCCIÓN	61
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS	63
4.3.1. Procedencia de semillas	63
4.3.2. Tratamientos pre-germinativos aplicados	63
4.3.3. Desinfección de semillas.....	63
4.3.4. Prueba de absorción de agua	63
4.3.5. Determinación del porcentaje y velocidad de germinación	64
4.3.6. Determinación de la actividad enzimática de β -glucosidasa, α -D-galactosidasa, β -1,3-glucanasa y α -amilasa.....	64
4.3.6.1. Obtención del extracto crudo enzimático a partir de polvos secos de acetona	64
4.3.6.2. Obtención del extracto crudo enzimático con regulador de acetato de sodio	65
4.3.7. Actividad enzimática de β -glucosidasa.....	65
4.3.8. Actividad enzimática de α -D-galactosidasa.....	66
4.3.9. Actividad enzimática de β -1,3-glucanasa	66
4.3.10. Actividad enzimática de α -amilasa	67

4.3.11. Proteína total	67
4.3.12. Azúcares reductores	68
4.3.13. Análisis estadístico.....	68
4.4. RESULTADOS	69
4.4.1. Absorción de agua después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos para reblandecer la testa de las semillas.....	69
4.4.2. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje y velocidad de germinación.....	71
4.4.3. Actividad enzimática específica en la semilla entera y sus componentes.....	74
4.4.4. Efecto de diferentes tratamientos para reblandecer la testa sobre la actividad enzimática específica de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa	76
4.5. DISCUSIÓN	79
4.5.1. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje y velocidad de germinación.....	79
4.5.2. Actividad enzimática específica en la semilla entera y sus componentes.....	81
4.5.3. Efecto de diferentes tratamientos para reblandecer la testa sobre la actividad enzimática específica de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa	83
4.6. CONCLUSIONES	84
4.7. LITERATURA CITADA	84
CAPÍTULO V	94
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	94
5.1. Conclusiones generales.....	94
5.2. Perspectivas.....	95
ANEXOS	96
Anexos A. Regímenes de temperatura sobre el porcentaje, velocidad de germinación y actividad enzimática de semillas de <i>L. exaltatus</i> y <i>C. longirostrata</i>	97
Anexos B. Tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje, velocidad de germinación y actividad enzimática de semillas de <i>L. exaltatus</i> y <i>C. longirostrata</i>	103

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1.	Análisis de varianza del efecto de temperatura, tiempo de germinación y su interacción para el porcentaje y velocidad de germinación de <i>C. longirostrata</i> y <i>L. exaltatus</i>	43
Cuadro 3.2.	Efecto del régimen de temperatura y el tiempo de germinación sobre el porcentaje (PG) y velocidad de germinación (VG) en <i>L. exaltatus</i> y <i>C. longirostrata</i>	45
Cuadro 3.3.	Análisis de varianza para la actividad enzimática específica por efecto de temperatura durante la germinación de semillas de <i>L. exaltatus</i> y <i>C. longirostrata</i>	47
Cuadro 4.1.	Análisis de varianza para la absorción de agua (g) de semillas de <i>L. exaltatus</i> y <i>C. longirostrata</i> después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos.....	70
Cuadro 4.2.	Análisis de varianza para el porcentaje y velocidad de germinación de semillas de <i>L. exaltatus</i> y <i>C. longirostrata</i> después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos.....	72
Cuadro 4.3.	Análisis de varianza para la actividad de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en semillas de <i>L. exaltatus</i> y <i>C. longirostrata</i> después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.	Evolución temporal de los acontecimientos físicos y metabólicos durante la germinación (fase 1 y 2) y el crecimiento de las plántulas (fase 3).....	12
Figura 2.2.	Influencia de la inducción de la síntesis de giberelina (AG) por parte del embrión sobre la inducción de hidrolasas que debilitan el endospermo micropilar y permiten su penetración por parte de la radícula.....	14
Figura 2.3.	Ruptura de la pared celular compuesta de galactomananos en el endospermo de semillas germinadas de lechuga.....	16
Figura 2.4.	Arreglo de las estructuras de la testa de la leguminosa <i>Pisum sativum</i>	21
Figura 3.1.	Porcentaje y velocidad de germinación promedio de semillas de <i>L. exaltatus</i> (a, b) y <i>C. longirostrata</i> (c, d) en cuatro regímenes de temperatura (25 °C constante, 30 °C/20 °C, 20 °C/15 °C y 5 °C 7 días + 20 °C/20 °C).....	44
Figura 3.2.	Actividad enzimática específica (U/mg de proteína total) de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en semillas de <i>L. exaltatus</i> sometidas a cuatro regímenes de temperatura (25 °C constante, 30 °C/20 °C, 20 °C/15 °C y 5 °C 7 días + 20 °C/20 °C) durante el tiempo de germinación (5, 10, 15 y 20 dds).....	48
Figura 3.3.	Actividad enzimática específica (U/mg de proteína total) de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en semillas de <i>C. longirostrata</i> sometidas a cuatro regímenes de temperatura (25 °C constante, 30 °C/20 °C, 20 °C/15 °C y 5 °C 7 días + 20 °C/20 °C) durante el tiempo de germinación (5, 10, 15 y 20 dds).....	49
Figura 4.1.	Peso acumulado de semillas (absorción de agua) de <i>L. exaltatus</i> (a) y <i>C. longirostrata</i> (b) después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos a través del tiempo	71
Figura 4.2.	Porcentaje y velocidad de germinación de semillas de <i>L. exaltatus</i> (a, b) y <i>C. longirostrata</i> (c, d) después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos.....	73
Figura 4.3.	Actividad enzimática específica de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en los componentes de las semillas de <i>L. exaltatus</i> (a, b) y <i>C. longirostrata</i> (c, d).....	75
Figura 4.4.	Actividad enzimática específica de α -D-galactosidasa (a), β -glucosidasa (b) en semillas de <i>L. exaltatus</i> bajo tratamientos pre-germinativos.....	77
Figura 4.5.	Actividad enzimática específica de α -D-galactosidasa (a) y β -glucosidasa (b) en semillas de <i>C. longirostrata</i> bajo tratamientos pre-germinativos.....	78

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción general

En la familia Fabaceae, la mayoría de las especies producen semillas con testa dura, las cuales no germinan aún si son sometidas a condiciones adecuadas para germinación (Baskin y Baskin, 2004). Esta condición en ocasiones está asociada a una latencia física aunque también con otros tipos de latencia; y tiene ventajas y desventajas. Entre las ventajas se tienen que la producción de este tipo de semillas contribuye a su dispersión evitando la germinación de todo el banco de semillas al mismo tiempo, permite que no se dañe el embrión durante el pasaje por el tracto digestivo de varias especies animales y ayuda a la recolonización rápida de áreas quemadas porque a menudo, el fuego hace permeables las testas (Dürhben de Souza y Marcos-Filho, 2001). En leguminosas forrajeras, la acumulación de semillas con este tipo de testa en los bancos de semilla ayuda a la perennización de las leguminosas en la pradera (Argel y Patton, 1999).

Sin embargo, las semillas con testa dura también contribuyen a la acumulación, en los bancos de semillas de áreas agrícolas, de semillas de malezas, aportando a la recurrencia de especies problema aún después de que la planta madre ha sido eliminada. También, la presencia de estas semillas en los lotes de semillas comerciales, contribuye a heterogeneidad en la emergencia, potencialmente reduce los rendimientos, retarda la cosecha y disminuye la habilidad del cultivo para competir con las malezas (Bacsiu-Miclaus, 1970). Estas semillas no son deseables durante el procesamiento de alimentos debido a los efectos indeseables en la calidad del producto. También, la presencia de latencia física, limita la domesticación de especies silvestres con potencial de uso en alimentación humana o animal como es el caso de los géneros *Lupinus* y *Crotalaria*.

Una característica de las testas duras, es la impermeabilidad, carácter heredable y controlado por uno o pocos genes, y altamente influido por el ambiente (Ramsay, 1997) que tiene un alto efecto en la composición química de las células que constituyen la testa (Argel y Patton, 1999; Tonini *et al.*, 2007). Se ha observado que es durante la última etapa de maduración de las semillas cuando la testa se vuelve impermeable. El mecanismo bioquímico varía entre las especies; y el sitio específico de impermeabilidad de cada especie es diferente entre los genotipos (Egley *et al.*, 1983). Esta impermeabilidad puede estar asociada a la presencia de una cutícula cerosa, concentraciones elevadas de Calcio (Ca) y bajas de Fósforo (P) en la testa, alta concentración de xilosa,

hemicelulosa (xilanas), presencia de una capa de compuestos fenólicos, alta lignificación de las células en empalizada, número y forma de los poros (Dürhben de Souza y Marcos-Filho, 2001; Mullin y Xu, 2001) y a la actividad enzimática de enzimas implicadas en el endurecimiento de la testa como las peroxidases (Gillikin y Graham, 1991). Sin embargo, la testa parece también participar en el control de la producción, modificación y/o almacenamiento de enzimas hidrolasas como endo β -mananasas, α -galactosidasas, β -manosidasas y β -glucosidasas, las cuales degradan al polisacárido de almacenamiento galactomanano de la pared celular del endospermo durante el inicio de la germinación (Tonini *et al.*, 2006; Tonini *et al.*, 2007; Minic, 2008; Tonini *et al.*, 2010).

Para que la radícula emerja requiere entre otros factores, disminuir la resistencia mecánica de la testa e incrementar la fuerza interna de expansión del embrión (Nonogaki *et al.*, 2010), para romper el endospermo y posteriormente la testa. En tomate, el rompimiento del endospermo en el sitio del micrópilo está asociado a la expresión de enzimas como la endo- β -mananasa y la xiloglucano endotransglucosilasa hidrolasa (XTH). En *Arabidopsis*, las XTH, expansinas y pectin metilesterasas están involucradas en la división celular y expansión de la pared celular del tejido que rodea el embrión. Específicamente las expansinas y las XTH, se cree que están implicadas en estimular la elongación celular por el debilitamiento de las paredes celulares del endospermo (Finkelstein *et al.*, 2008). Otras enzimas que están implicadas en la degradación de la pared celular y se han asociado con la ruptura del endospermo en tomate son las β -1,3-glucanasa y quitinasa (Wu *et al.*, 2001). En semillas de *Lupinus angustifolius*, la movilización de los compuestos de reserva en los cotiledones durante la germinación está dada principalmente por la enzima exo- β -1,4-galactanasa. Durante la movilización, las paredes de reserva cambian su textura debido a que la mayor parte de los galactanos son hidrolizados (Buckeridge *et al.*, 2005).

La actividad de las enzimas en semillas de testa dura puede cambiar con la aplicación de tratamientos de escarificación que inducen la germinación. En las semillas de *Origanum vulgare* hay un incremento de la actividad de las enzimas con la germinación después de la aplicación de tratamientos de escarificación, indicando que la α -amilasa y β -1,3-glucanasa tienen un rol importante en la germinación de estas semillas (Dehghanpour *et al.*, 2011).

Las semillas de fabáceas silvestres del género *Crotalaria* y *Lupinus* presentan latencia, la cual parece estar asociada a la impermeabilidad de la testa (Pablo-Pérez *et al.*, 2013; Lagunes-Espinoza *et al.*, 2014, Juárez-Fuentes y Lagunes-Espinoza, 2014). Para reblandecer o debilitar la testa y que

emerja la radícula en especies con testa dura se han aplicado diferentes tratamientos de escarificación (Elliot *et al.*, 2011; Tapia *et al.*, 2014). Durante este proceso hay cambios en la actividad metabólica de las semillas, por ejemplo, en la actividad de enzimas implicadas en el debilitamiento de las paredes celulares (Wu *et al.*, 2001; Finkelstein *et al.*, 2008; Scheler *et al.*, 2015). En *L. angustifolius* se ha estudiado el rol de la exo- β -1,4-galactanasa en la movilización de polisacáridos de las paredes celulares de los cotiledones durante la germinación (Buckeridge *et al.*, 2005); y en semillas de *L. luteus* la actividad de α -D-galactosidasa (Lahuta *et al.*, 2000). Con estos antecedentes se plantean las siguientes interrogantes: ¿Qué enzimas relacionadas con la degradación de paredes celulares están presentes en los componentes de las semillas de Chipilín (*C. longirostrata*) y Lupino (*L. exaltatus*) y cuál es su nivel de actividad? ¿Estas enzimas se activan durante la liberación de latencia por efecto de tratamientos de escarificación? ¿Está su actividad relacionada con la germinación? La respuesta a estas interrogantes ayudaría a entender los mecanismos involucrados en el proceso de liberación de la latencia y avanzar en el conocimiento del proceso germinativo de estas especies, proceso clave para su aprovechamiento sustentable.

Esta tesis se divide en cuatro capítulos principales:

El capítulo I está compuesto por la introducción general, los objetivos y la hipótesis.

El capítulo II consiste en la revisión de literatura acerca de las características más importantes de las especies de *C. longirostrata* y *L. exaltatus*. También, comprende el proceso de germinación y la latencia de semillas de leguminosas, los mecanismos y tratamientos para liberar la latencia física, y el rol de las enzimas sobre la ruptura de la testa y germinación de las semillas.

El capítulo III presenta el estudio del efecto de regímenes de temperatura en el porcentaje, velocidad de germinación y actividad enzimática en semillas de *L. exaltatus* y *C. longirostrata*.

El capítulo IV presenta el estudio del efecto de tratamientos pre-germinativos en el porcentaje, velocidad de germinación y actividad enzimática en semillas de *L. exaltatus* y *C. longirostrata*.

1.2. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de la temperatura y de tratamientos pre-germinativos sobre la germinación y actividad enzimática de las especies *Crotalaria longirostrata* y *Lupinus exaltatus*.

Objetivos específicos

1. Determinar la actividad de las enzimas β -1,3-glucanasa, β -glucosidasa, α -D-galactosidasa y α -amilasa en las semillas enteras, testa y cotiledones.
2. Determinar el efecto del régimen de temperatura y de tratamientos pre-germinativos (físico-químicos) en el porcentaje y velocidad de germinación.
3. Determinar el efecto del régimen de temperatura sobre la actividad de las enzimas β -1,3-glucanasa, β -glucosidasa, α -D-galactosidasa y α -amilasa a los 5, 10, 15 y 20 días después de germinación.
4. Determinar el efecto de tratamientos pre-germinativos a las 0, 6, 18, 36, 72 y 120 h, en las enzimas que mostraron mayor actividad en semillas enteras, utilizando el régimen de temperatura donde se observó el mayor porcentaje y velocidad de germinación.

1.3. Hipótesis

El o los regímenes de temperatura que simulen a aquel o aquellos cuando las semillas de *C. longirostrata* y *L. exaltatus* germinan en campo, en combinación con aquellos que reblandezcan la testa, bajo condiciones de laboratorio, promoverán la germinación mostrando un cambio en la actividad enzimática de β -1,3-glucanasa, β -glucosidasa, α -D-galactosidasa y α -amilasa.

1.4. Literatura citada

Argel, P. J., and C. J. Patton. 1999. Overcoming legume hard seedness. *In: Forage seed production: Tropical and sub-tropical species*. Loch D. S., and J. E. Ferguson. (eds.). Vol. 2. Chapter 14. CAB International, Wallingford. pp: 247-265.

Bacsiu-Miclaus, D. 1970. Contributions to the study of hard seed and coat structure properties of soybeans. *Proceedings of the International Seed Testing Association*. 35: 599-617.

Baskin, J. M., and C. C. Baskin. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*. 14: 1-16.

Buckeridge, M. S., I. S. Hutcheon, and J. S. G. Reid. 2005. The role of exo-(1→4)- β -galactanase in the mobilization of polysaccharides from the cotyledon cell walls of *Lupinus angustifolius* following germination. *Annals of Botany*. 96: 435-444.

Dehghanpour, F. H., R. Tavakkol A, F. Sharifzadeh, and S. Chavoshinasab. 2011. Germination improvement and α -amylase and β -1,3-glucanase activity in dormant and non-dormant seeds of Oregano (*Origanum vulgare*). *Australian Journal of Crop Science*. 4: 421-427.

Dürhben de Souza, F. H., and J. Marcos-Filho. 2001. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. *Revista Brasileira de Botânica*. 24: 365-375.

Egley, G. H., R. N. Paul, K. C. Vaughn, and S. O. Duke. 1983. Role of peroxidase in the development of water-impermeable seed coats in *Sida spinosa* L. *Planta*. 157: 224-232.

Elliott, C. W., D. G. Fischer, and C. J. LeRoy. 2011. Germination of three native *Lupinus* species in response to temperature. *Northwest Science*. 2: 403-410.

Finkelstein, R., W. Reeves, T. Ariizumi, and C. Steber. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 387-415.

Gillikin, J. W., and J. S. Graham. 1991. Purification and developmental analysis of the major anionic peroxidase from the seed coat of *Glycine max*. *Plant Physiology*. 96: 214-220.

Juárez-Fuentes, B., y L. E. Lagues-Espinoza. 2014. Germinación como un proceso que mejora la calidad nutritiva de leguminosas tropicales. II. Congreso Internacional y XVI Congreso Nacional de Ciencias Agronómicas, 23-25 abril, Chapingo, México. pp: 217-218.

Lagues-Espinoza, L. E., J. López-Upton, y P. Ruiz-Gil. 2014. Respuesta de tres especies de *Lupinus* a diferentes tratamientos-pregerminativos. II Congreso Internacional y XVI Congreso Nacional de Ciencias Agronómicas, 23-25 abril, Chapingo, México. pp: 387-388.

Lahuta, L. B., R. J. Górecki, D. Michalczyk, and A. I. Piotrowicz-Ciéslak. 2000. Alpha-D-galactosidase activity in stored yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. *Electronic Journal of Polish Universities, Agronomy*. 3: 1-8.

Minic Z. 2008. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta*. 227: 723-740.

Mullin, W. J., and W. Xu. 2001. Study of soybean seed coat components and their relationship to water absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 5331-5335.

Nonogaki, H., G. W. Bassel, and J. D. Bewley. 2010. Germination-Still a mystery. *Plant Science*. 179: 574-581.

Pablo-Pérez, M., L. C. Lagues-Espinoza, J. López-Upton, J. Ramos-Juárez, y E. M. Aranda-Ibáñez. 2013. Morfometría, germinación y composición mineral de semillas de *Lupinus silvestres*. *Bioagro*. 25: 101-108.

Ramsay, G. 1997. Inheritance and linkage of a gene for testa-imposed dormancy in faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant breeding*. 116: 287-289.

Scheler, C., K. Weitbrecht, S. P. Pearce, A. Hampstead, A. Büttner-Mainik, K. J. D. Lee, A. Voegelé, K. Oracz, B. J. W. Dekkers, X. Wang, A. T. A. Wood, L. Bentsink, J. R. King, J. P. Knox, M. J. Holdsworth, K. Müller, and G. Leubner-Metzger. 2015. Promotion of testa rupture during garden cress germination involves seed compartment-specific expression and activity of pectin methylesterases. *Plant Physiology*. 167: 200-215.

Tapia, A. M., A. Romero, V. Luque, P. Gervasoni, S. Aybar, A. Lobo F., y I. Gomez. 2014. Influencia de la escarificación física en la germinación de semillas de tipa colorada (*Pterogyne nitens* Tul ex Benth). *Revista agronómica del noroeste argentino*. 2: 58-59.

Tonini, P. P., C. G. S. Lisboa, C. O. Silva, S. C. Mazzoni-Viveiros, and M. S. Buckeridge. 2007. Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. *Trees*. 21: 13-21.

Tonini, P. P., C. G. S. Lisboa, L. Freschi, H. Mercier, S. C. Mazzoni-Viveiros, and M. S. Buckeridge. 2006. Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and endo- β -mannanase activity in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (*Leguminosae*). *Trees*. 20: 669-678.

Tonini P. P., E. Purgatto, and M. S. Buckeridge. 2010. Effects of abscisic acid, ethylene and sugars on the mobilization of storage proteins and carbohydrates in seeds of the tropical tree *Sesbania virgata* (Leguminosae). *Annals of Botany*. 106: 607-616.

Wu, C., G. Leubner-Metzger, F. Meins, J., and K. J. Bradford. 2001. Class I β -1,3-glucanase and chitinase are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiology*. 126: 1299-1313.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia de las fabáceas en la alimentación

México es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, cuenta con un significativo número de plantas cultivadas y sus parientes silvestres, importantes para el ser humano. Ambos, representan reservorios de genes y son esenciales para la mejora de las variedades cultivadas (CONABIO, 2006). Las plantas silvestres cuentan con una alta diversidad y proveen alimentos para la subsistencia de pueblos indígenas y rurales (Tena *et al.*, 2012). Estas plantas alimenticias son recolectadas en las cercanías de las viviendas y en el campo, las partes más consumidas son los frutos y las hojas y las menos frecuente los tallos y las flores (Biurrun *et al.*, 2007). Entre ellas, se encuentran las fabáceas silvestres y las semidomesticadas, fuente de proteína, minerales y antioxidantes para la dieta humana y animal.

Las fabáceas silvestres proporcionan a las familias rurales disponibilidad sostenida y seguridad alimentaria. Los usos que tienen se clasifican en alimenticios, medicinales, rituales, culturales, en transformación, forraje, combustible, abono verde, ornamentales, industria químico-farmacéutica, insecticidas-fungicidas, maderables, melíferas, etc. (Izaguirre, 2005; Jacobsen y Mujica, 2006). Se consideran plantas resistentes a la sequía y a otras condiciones ambientales adversas, y son recolectadas en tiempos de abundancia y escasez. Favorecen la cadena alimenticia humana porque nitrifican el suelo donde crecen y sirven como forraje en la alimentación animal (Graham y Vance 2003; Fraile *et al.*, 2007).

En fabáceas silvestres mexicanas se han observado rangos en contenidos de proteína cruda, aceites y fibra total en las semillas que van de 32.5-43.5 %, 8.5-23.5 % y 14-26 %, respectivamente. Sus lípidos son ricos en ácidos grasos insaturados y presentan características fisicoquímicas aptas para su uso comercial (Pablo-Pérez *et al.*, 2015; Ortega-Nieblas y Vázquez-Moreno, 1995; Tosh y Yada, 2010). Además, poseen alto contenido de azúcares, ácidos y vitaminas. Se consumen en diferentes formas como hervidas, secas o frescas, sopas y también, se pueden mezclar con el trigo para la elaboración de pan o galletas (Buxó, 2008). Las dietas con fabáceas ayudan a la salud

humana, porque proporcionan sustancias antioxidantes y anticancerígenas como el ácido fítico (Silveira *et al.*, 2003). Asimismo, se pueden prevenir enfermedades cardiovasculares con el consumo de semillas de *Ebenopsis caesalpinoides* (Pío-León *et al.*, 2013).

También se utilizan en la alimentación animal, por ejemplo, las especies *Desmodium* sp., *Lupinus* sp., *Medicago polymorpha* L., *Vicia andicola* Kunth son consumidas por el ganado bovino, equino, caprino, porcino y ovino; las partes que se han manejado, como forraje o pastoreo, van desde la planta entera, las ramas y las hojas (Castañeda *et al.*, 2014). De igual forma, se han propuesto métodos de conservación de forraje como el ensilaje, para las especies de *L. exaltatus* y *L. rotundiflorus* (Herrera-Velazco *et al.*, 2010; Herrera-Velazco *et al.*, 2015). Con esta técnica se evitan las pérdidas de materia seca y nutrientes, y se pueden almacenar para su posterior uso en épocas críticas.

Por otro lado, existe una alta demanda de proteína vegetal. En América Central, donde se encuentra México se observa una tendencia al alza en el requerimiento de proteína vegetal, principalmente de soya por su uso en alimentación animal e industria alimenticia, con un incremento en las importaciones. En México, se consumen alrededor de 82 g *per cápita* al día de proteínas vegetales (FAO, 2014).

2.1.1. El género *Lupinus*

El género *Lupinus* pertenece a la familia Fabaceae y es uno de los más grandes y extensos geográficamente, con alta diversidad de especies. Se distribuyen en las regiones subárticas de Alaska, regiones Mediterráneas, también en climas semidesérticos; en tierras altas y montañosas como las regiones del este de África, México y los Andes; en climas cálidos de las regiones de Estados Unidos de América y subtropicales del este de América del Sur (Wolko *et al.*, 2011).

En México, aproximadamente 100 especies silvestres se han identificado y la mayoría se encuentra en la Sierra Madre Occidental y el Eje Neovolcánico Transversal (Ruiz *et al.*, 2006). En el estado de Jalisco, se han encontrado 12 especies del género *Lupinus*, distribuidas extendidamente en la Sierra Huichola (*L. leptocarpus*), Eje Neovolcánico Transversal, Cerro de Tequila, Sierra de Quila, Nevado de Colima (*L. splendens*, *L. exaltatus*, *L. stipulatus*, *L. reflexus*, *L. montanus* y *L.*

aschenbornii), Sierra Madre del Sur, Sierra de Manantlán (*L. elegans*, *L. simulans*, *L. rotundiflorus* y *L. madrensis*) y Altiplano Mexicano (*L. mexicanus*) (Ruiz *et al.*, 2000).

Lupinus exaltatus Zucc es una especie abundante en Jalisco y se encuentra en zonas de bosques de pino y encino; es considerada una maleza en zonas cultivadas. También se encuentra en suelos con pH neutro a ácido en la región centro-oriente del estado de Puebla (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2012). Es una leguminosa perenne con una altura de 1 a 2 m. Los tallos de las ramas tienen de 3 a 3.5 mm de diámetro, los cuales son huecos, finos e hispídulos. Las vainas miden de 4 a 4.5 cm de largo, de 8 a 9 mm de ancho, son vellosas con pelos de 1.5 mm de largo (Dunn, 1979). La floración de esta especie ocurre en los meses de agosto y enero (Bañuelos *et al.*, 2006).

El análisis proximal de semillas de *L. mexicanus* Cerv. ex Lag., *L. exaltatus* Zucc, *L. montanus* H. B. K. y *L. stipulatus* J. Agardh mostró que el contenido de proteína varió de 334 a 467 g kg⁻¹ y el de fibra de 106 a 172 g kg⁻¹ en peso seco. En cuanto al contenido de aceites, se presentó en mayor concentración el ácido palmítico y el ácido linoleico, estos variaron de 175 a 287 y 324 a 517 g kg⁻¹, respectivamente (García-López *et al.*, 2001). Para el caso de *L. exaltatus*, se han encontrado valores similares de proteína de 307 a 404 g kg⁻¹ Materia Seca (MS) (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2012). Las semillas y el follaje de *L. exaltatus* son ricos en proteínas, por lo tanto, estas partes de la especie pueden ser usados en las raciones de los animales previa reducción de alcaloides (Ruiz *et al.*, 2006; Pablo-Pérez *et al.*, 2015). En *L. rotundiflorus* el ensilado permite reducir los alcaloides (Herrera-Velazco *et al.*, 2015).

2.1.2. El género *Crotalaria*

El género *Crotalaria* es miembro de la familia Fabaceae, se encuentra distribuido en los trópicos y subtrópicos en todo el mundo. En Estados Unidos, han sido reportadas 56 especies (NRCS, 2015). Algunas fueron introducidas para la mejora del suelo, control de la erosión y como forraje en los años 1940's y 1950's. Posteriormente, fueron abandonadas porque resultaron ser venenosas y las consideraron malezas invasoras por superar a otras especies (Leverett y Woods, 2012).

Crotalaria longirostrata Hook & Arn., es popular en Guatemala y el Salvador y fue exportada a los Estados Unidos de América por los emigrantes. Se distribuye de México a Panamá, habita en

bosques de pino-encino desde el nivel del mar hasta 2300 msnm (Chízmar, 2009). El chipilín, chipil, chipile, como comúnmente se le conoce, es apetecido por sus hojas, que se consumen como verdura o mezcladas con frijoles, carne molida o huevos revueltos. El follaje es rico en calcio, hierro, tiamina, riboflavina, niacina, y ácido ascórbico. Sin embargo, las semillas y las raíces de la planta son tóxicas (Morton, 1994).

El chipilín es una rica fuente de proteína. Por ello, en el trópico de México, es utilizado como forraje de corte para la alimentación de rumiantes. El porcentaje de proteína cruda de la materia seca varía en cada parte de la planta: 30.6, 36.3 y 38.3 % en tallos con hojas, hojas con pecíolo y las hojas, respectivamente (Arias *et al.*, 2003). Sin embargo, contiene 0.31 % de alcaloides pirrolizidínicos en las semillas (Williams y Molyneux, 1987). Especies de *Crotalaria*, se han usado para alimentar pollitos con el objetivo de analizar la toxicidad oral de los alcaloides de las semillas. Los resultados mostraron que *C. argyrolobioides* Bak (1.01 %) ocasionó signos tóxicos, pero no muertes cuando se alimentó con 10 mg g⁻¹ de peso corporal, mientras que, *C. spectabilis* Roth (3.85 %), *C. retusa* L. (2.69 %), *C. alata* Leveille (1.60 %) y *C. quinquefolia* L. (1.19 %) fueron letales cuando se alimentaron a pollitos con dosis de 2 a 6 mg g⁻¹ de peso corporal (Williams y Molyneux, 1987).

2.2. El proceso de germinación

La germinación empieza con la absorción de agua por la semilla, imbibición, y termina con la emergencia del eje embrionario, radícula, misma que atraviesa las estructuras que la rodean (Bewley, 1997; Bewley *et al.*, 2013). Para propósitos de prueba de germinación de la semilla, Moreno (1996) la define como la emergencia y desarrollo de estructuras esenciales que provienen del embrión, y que manifiestan la capacidad de la semilla para producir una planta normal bajo condiciones favorables. Este proceso se divide en tres fases como se muestra en la Figura 2.1 y depende de muchos factores externos e internos. Entre los externos se encuentran la luz, la temperatura, la humedad y el oxígeno (Raven *et al.*, 1992). En los internos o inherentes a la semilla, el tamaño, el contenido de sustratos hidratables, la permeabilidad de la cubierta seminal y la toma de oxígeno (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

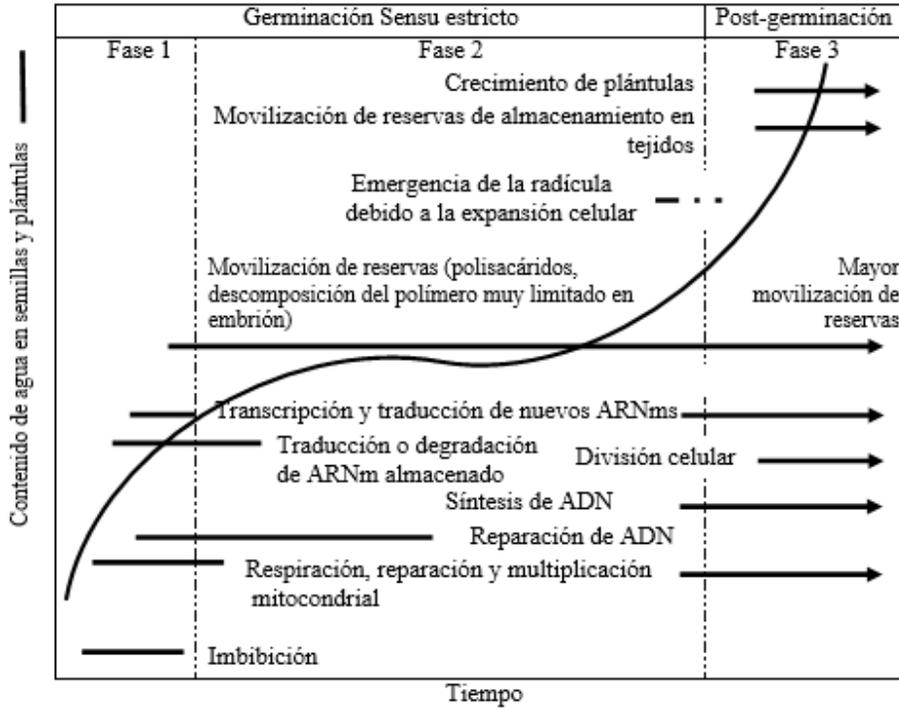


Figura 2.1. Evolución temporal de los acontecimientos físicos y metabólicos durante la germinación (fase 1 y 2) y el crecimiento de las plántulas (fase 3). El tiempo varía entre las especies y está influenciado por las condiciones de germinación. La curva muestra la absorción de agua (Nonogaki *et al.*, 2010).

2.2.1. El rol de las enzimas durante las etapas de germinación

Imbibición de agua: Se rehidratan las proteínas y organelos celulares y también ocurren reacciones hidrolíticas. La rehidratación de las semillas permite que las enzimas y cada estructura se reactiven para iniciar su metabolismo. En la primera fase predomina el proceso glicolítico. La actividad metabólica empieza con las mitocondrias existentes y se activan las enzimas del ciclo de Krebs y oxidasas terminales (Herrera *et al.*, 2006).

Síntesis y activación de sistemas enzimáticos: Ocurre la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, se incrementan las actividades enzimáticas y se inicia la movilización de los compuestos de reserva (afectado por la formación de enzimas y por la actividad enzimática). Por lo que, esta fase es anabólica y endergónica debido al consumo de energía. También, ocurren cambios

transcripcionales en la elongación y división celular. Las hormonas giberelinas son las encargadas de activar algunos de los genes (Herrera *et al.*, 2006).

Degradación de las sustancias de reserva (carbohidratos): En semillas de leguminosas no endospermicas, el endospermo se descompone como fuente de nutrientes durante su desarrollo siendo residual (soya) o ausente (chícharo, frijol) cuando llega a la maduración. Los cotiledones asumen el rol de órgano de almacenamiento. En las leguminosas no endospermicas, la hidrólisis del almidón en los cotiledones se inicia después de la germinación y es bifásica en el chícharo. La fase lenta es dada por la fosforilasa y la fase rápida dada por las α y β -amilasas. La hidrólisis del almidón es ayudada por la desintegración de la membrana del amiloplasto exponiendo al almidón a las enzimas citosólicas, entre ellas, la dextrinasa y la fosforilasa. En los cotiledones, después de la germinación de semillas de garbanzo, soya verde y frijol se ha reportado una alta actividad amilolítica (Bewley *et al.*, 2013). La amilosa y amilopectina son hidrolizadas por la α -amilasa quien rompe los enlaces 1 \rightarrow 4 glucosídicos. Los oligosacáridos liberados se siguen hidrolizando por α -amilasa con ayuda de α -glucosidasa hasta producir glucosa.

En leguminosas de la tribu Trifolieae (fenogreco, algarroba y guar), el endospermo es el sitio de almacenamiento de carbohidratos, se encuentra entre la testa y los cotiledones, contiene el carbohidrato de almacenamiento galactomanano. Este comienza a moverse cuando emerge la radícula. La hidrólisis empieza cerca de la capa de aleurona (región más externa del endospermo, desprovista de galactomanano) y avanza hacia los cotiledones hasta que se agotan las reservas. La síntesis y remoción es dada por las enzimas α -galactosidasa, β -manosidasa y endo- β -mananasa (hidroliza enlaces de manosa). La α -galactosidasa (exo enzima) rompe los enlaces α (1 \rightarrow 6) entre las cadenas largas de galactosa y manosa, estos azúcares son absorbidos a través de difusión pasiva por los cotiledones, aunque en estos no se acumulan, sino que se metabolizan más de estos carbohidratos (Bewley *et al.*, 2013).

En semillas de lupinos, los arabinogalactomananos se encuentran en las paredes celulares de los cotiledones y están compuestos de enlaces β (1 \rightarrow 4) galactosa con residuos de cadenas laterales de α (1 \rightarrow 5) arabinosa. Estas hemicelulosas son degradadas junto con las reservas de almacenamiento como las proteínas y los lípidos para la emergencia de la radícula (Bewley *et al.*, 2013). El catabolismo de los oligosacáridos, rafinosa (galactosil-sacarosa) y estaquiosa (digalactosil-sacarosa), se lleva a cabo por diversas enzimas. Las unidades de galactosa son degradadas por la

enzima α -galactosidasa, y las de sacarosa son hidrolizadas por la invertasa. La α -galactosidasa se sintetiza generalmente durante el desarrollo de la semilla y está presente en semillas secas. En *L. luteus*, los niveles de rafinosa en el tejido embrionario excede el 20 % de su peso seco. Durante el inicio del proceso de germinación, los polisacáridos son la primera fuente de energía para la síntesis de otros compuestos (Lahuta *et al.*, 2000).

En semillas de *L. angustifolius*, la movilización de los compuestos de reserva en los cotiledones está dada principalmente por la enzima exo-1,4- β -galactanasa. Durante la movilización, las paredes de reserva cambian su textura debido a que se hidroliza la mayor parte de la galactana (Buckeridge *et al.*, 2005).

Elongación de las células del embrión y emergencia de la radícula: Para que ocurra esta fase se requiere el debilitamiento de la testa, ocasionado por la degradación de la pared celular por las enzimas α -galactosidasa, β -manosidasa y endo- β -mananasa producidas en el endospermo. Las giberelinas tienen un rol importante en la activación de las enzimas hidrolasas que permiten la emergencia de la radícula (Figura 2.2).

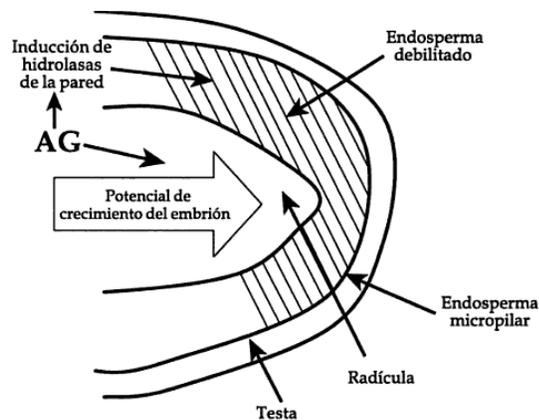


Figura 2.2. Influencia de la inducción de la síntesis de giberelina (AG) por parte del embrión sobre la inducción de hidrolasas que debilitan el endospermo micropilar y permiten su penetración por parte de la radícula (Herrera *et al.*, 2006).

Entre las hidrolasas implicadas en el debilitamiento de los tejidos de la pared celular, en el endospermo de numerosas semillas, se encuentran las expansinas que tienen la capacidad de causar

la extensión de las paredes celulares aisladas. Esta puede estar implicada en el crecimiento del embrión y debilitamiento del endospermo durante la germinación (Nonogaki *et al.*, 2007).

Las xiloglucano endotransglicosilasas hidrolasas (XTH) modifican los xiloglucanos, estos son el mayor componente de la pared celular primaria de las semillas dicotiledóneas. Están involucradas en muchos procesos de desarrollo, incluyendo el crecimiento celular, madurez del fruto y movilización de los xiloglucanos de reserva de las semillas durante la germinación (Nonogaki *et al.*, 2007).

Las enzimas endo- β -mananasa, α -galactosidasa y β -manosidasa están envueltas en la degradación de los mananos durante la germinación (Figura 2.3). Estos son polisacáridos hemicelulósicos presentes en el endospermo de las semillas de muchas especies de plantas. La enzima endo- β -mananasa hidroliza al azar los enlaces internos β -D-(1,4)- manopiranosil en el polímero manano. Esta enzima muestra un incremento durante la germinación. Las β -manosidasas hidrolizan el residuo terminal no reductor β -D-manosa en los oligomananos liberado por la acción de endo- β -mananasas y α -galactosidasas. La actividad enzimática de β -manosidasa se ha detectado en el endospermo micropilar de numerosas semillas. La enzima celulasa o endo- β -1,4-glucanasa es la llave para la degradación de la celulosa. Se ha detectado actividad enzimática durante la germinación de numerosas semillas incluyendo las de tomate y café (Nonogaki *et al.*, 2007).

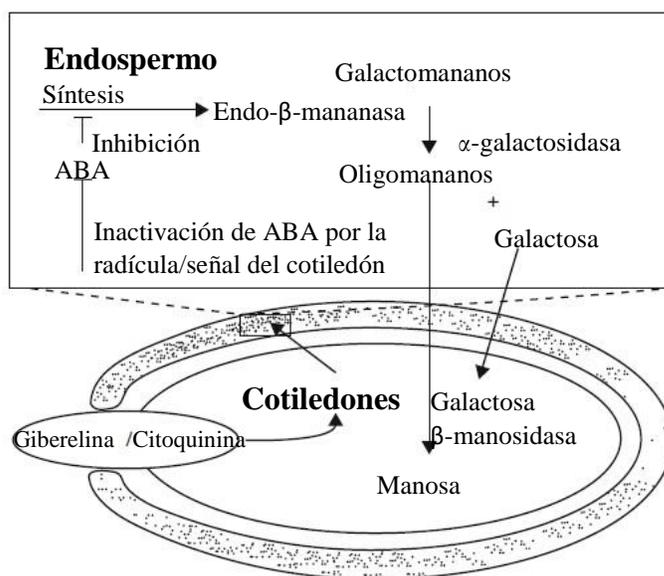


Figura 2.3. Ruptura de la pared celular compuesta de galactomananos en el endospermo de semillas germinadas de lechuga. Durante la germinación, una señal pasa del eje a través de los cotiledones al endospermo, después de la germinación, se supera el efecto negativo del ácido abscísico (ABA) que actúa como inhibidor endógeno sobre la síntesis de la endo-β-mananasa. La actividad de la α-galactosidasa se incrementa por la degradación de la pared celular de galactomananos. Los oligomananos resultantes son hidrolizados a manosa por la β-manosidasa presente dentro de la pared celular del cotiledón. La galactosa y la manosa se convierten en glucosa y luego a sacarosa para el transporte y utilización de la planta en crecimiento como fuente de energía hasta que empiece la movilización de los lípidos (Bewley *et al.*, 2013).

El endospermo en la germinación

El endospermo es una fuente temporal de nutrición, también permite espacio para el crecimiento del embrión y actúa como amortiguador entre el organismo materno y su descendencia. Las propiedades del endospermo aseguran que el joven embrión se desarrolle dentro de un entorno homeostático necesario para llevar a cabo la embriogénesis (Melkus *et al.*, 2009).

En leguminosas, semillas no endospérmicas, presentan una mayor germinación y velocidad que las semillas endospérmicas. Valencia-Díaz *et al.* (2015) trabajaron con *Crotalaria pumila* (endospérmica) y *Medicago sativa* (no endospérmica) para ver si la presencia o ausencia del

endospermo afectaba la germinación y encontraron que, el porcentaje de germinación en semillas con endospermo fue menor (79.25 ± 6.34 %) en relación a las no endospérmicas (92.25 ± 8.50 %). El tiempo promedio de germinación en semillas con endospermo fue mayor (3.90 ± 0.36 días) que las que no tienen endospermo (2.31 ± 0.36 días).

2.2.2. Control de la germinación

La germinación puede estar controlada por alguna de las estructuras de la propia semilla y también por condiciones ambientales. La testa o cubierta actúa como barrera de difusión de oxígeno y por consiguiente de la oxidación (Mayer y Shain, 1974). La testa también produce restricción mecánica que puede ser superada por el potencial de crecimiento del embrión. Hay dos formas de liberación de la restricción de la testa: 1) ocurre un debilitamiento del tejido antes de la germinación y este produce enzimas para el proceso; 2) cuando la testa presenta alteraciones o rupturas de tejido antes de la germinación, el endospermo produce enzimas que facilitan la ruptura de la testa. El endospermo actúa como barrera mecánica de la germinación de las semillas. Por lo que, es necesario un debilitamiento para la protrusión de la radícula. El debilitamiento del endospermo puede ser promovido por las giberelinas y, al menos en parte, inhibido por el ácido abscísico (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

Entre los factores ambientales que controlan la germinación de la semilla, se encuentra el agua, la luz, la temperatura, el oxígeno, diversas sustancias químicas y las interacciones entre ellos (Kozłowski y Pallardy, 1997).

2.3. Latencia, su papel biológico e implicaciones

La latencia es un bloqueo a la germinación de semillas viables bajo condiciones favorables (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Es un estado interno de la semilla que impide su germinación bajo condiciones favorables de humedad, temperatura y oxígeno (Benched-Arnold *et al.*, 2000). También, es considerada un atributo común en las semillas de malezas lo que impide predecir su emergencia bajo condiciones de campo (Batlla y Benched-Arnold, 2007).

De igual forma, se presenta latencia cuando las condiciones ambientales son adversas para el crecimiento y reproducción durante alguna época del año. Entre los factores ambientales que

eliminan la latencia de la semilla están las fluctuaciones de temperatura, el contenido de agua del suelo, la calidad y densidad del flujo de luz, la concentración de nitratos (Forcella *et al.*, 2000).

2.3.1. Clasificación de la latencia

De acuerdo a Baskin y Baskin (2004), la latencia se clasifica en fisiológica, morfológica, morfo-fisiológica, física y combinada (física más fisiológica):

Latencia fisiológica. Existen tres niveles: profunda, intermedia y no profunda. En la **profunda**, el embrión suprimido produce plántulas anormales, las giberelinas no promueven la germinación y las semillas requieren de 3 a 4 meses de estratificación en frío para germinar. En la **intermedia**, el embrión suprimido produce plántulas normales, en algunas especies, las giberelinas promueven la germinación, las semillas requieren de 2 a 3 meses de estratificación fría para romper la latencia, el almacenamiento en seco puede acortar este periodo de estratificación. Y finalmente en la **no profunda**, el embrión produce plántulas normales, las giberelinas promueven la germinación. Sin embargo, dependiendo de la especie se puede romper latencia con estratificación fría (0-10 °C) o caliente (15 °C) para promover la germinación.

Latencia morfológica. El embrión es pequeño y diferenciado, no está fisiológicamente activo y no requieren tratamiento para romper latencia y germinar. Únicamente necesitan un determinado tiempo para crecer a tamaño completo y germinar. En condiciones apropiadas, las semillas recién maduras crecen en una o dos semanas y en 30 días pueden germinar.

Latencia morfo-fisiológica. Las semillas tienen un embrión subdesarrollado con un componente fisiológico de latencia. Para que haya germinación es necesario de un tratamiento previo para romper latencia. La emergencia de la radícula requiere de un periodo de tiempo más largo que las semillas con latencia morfológica. Existen ocho niveles de latencia morfo-fisiológica.

Latencia física. Es dada por una o más capas de células en empalizada impermeables al agua localizadas en la testa de la semilla. La ruptura de este tipo de latencia puede ser natural o artificial. Sucede con la abertura de una parte de la estructura de la capa para que permita el paso del agua al embrión.

Latencia combinada. Semillas que presentan la combinación de latencia física más la fisiológica. Las testas de estas semillas son impermeables al agua y el embrión es fisiológicamente inactivo. Los embriones de estas semillas recién maduras tienen cierta latencia condicional. Algunas requieren de estratificación fría para después imbibir y germinar.

2.3.2. Mecanismos para liberar la latencia

La latencia de semillas de fabáceas dada por la impermeabilidad de la testa puede ser eliminada por los métodos de escarificación térmica, química y/o mecánica lo que permite la aceleración del proceso de germinación, estos métodos forman parte de la tecnología tradicional agrícola. Sin embargo, se deben utilizar tratamientos que estimulen la germinación y que incrementen el vigor de las plantas durante la emergencia. Por lo que, también se usan tratamientos de hidratación y deshidratación (González *et al.*, 2006). De igual forma se ha empleado la combinación de escarificación y temperatura para la germinación de semillas de fabáceas.

Tratamientos ácidos

En diversos estudios han usado la escarificación química con ácido sulfúrico (H_2SO_4). Reino *et al.* (2011) escarificaron con 10 min de inmersión en H_2SO_4 y en combinación con una temperatura alterna de 25 °C/30 °C se eliminó la latencia exógena de las especies de *Indigofera* sp., *Desmanthus virgatus*, *Clitoria ternatea* y *Centrosema pubescens* obteniendo 100 %, 25 %, 45 % y 72 % de germinación respectivamente. Sin embargo, en algunas leguminosas forrajeras como *Cratylia argentea*, la inmersión en H_2SO_4 concentrado durante 16 min no favoreció la germinación en relación al testigo al causar la muerte de un alto porcentaje de semillas, en cambio, *Cassia moschata* disminuyó en un 80 % la dureza, con 16 % de semillas muertas y 64 % de germinación (Sanabria *et al.*, 2004).

Otro ácido que actúa como estimulante de crecimiento, ya que es una hormona, y que puede romper la latencia de las semillas es el ácido giberélico (AG_3). Se han hecho estudios donde el efecto no ha sido favorable, dado principalmente a la concentración, el tiempo de exposición y a que la cubierta de las semillas es impermeable. Se recomienda antes de la aplicación del AG_3 la escarificación mecánica de la semilla (Atencio *et al.*, 2003).

Tratamientos mecánicos

Para eliminar las cubiertas duras de las fabáceas, se ha aplicado inyección de aire comprimido con un escarificador mecánico, con cuerpo de metal recubierto interiormente de lija gruesa durante tres tiempos (30, 60 y 120 segundos). No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tiempos de escarificación. A los 30 segundos, el porcentaje de germinación fue de 91 %, 91 % y 95 % en *Medicago lupulina*, *Medicago littoralis* y *Medicago polymorpha* respectivamente (Oliveira *et al.*, 2007). Por otra parte, para propagar de manera eficiente a la especie *Sesbania*

punicea se requiere de un tratamiento pregerminativo. Tapia *et al.* (2014a) evaluaron diferentes tratamientos, donde el lijado de la semilla (escarificación mecánica) mostró mejor germinación con el 80 %.

Tratamientos térmicos

En la fabácea *Leucaena leucocephala* se han aplicado tratamientos de agua a 80 °C y 100 °C con posterior imbibición de la semilla escarificada. Se encontró que al someter las semillas de leucaena con los niveles más altos de imbibición (24 y 48 h) y tiempo de escarificación (45 y 60 seg) se incrementó el porcentaje de germinación hasta un 90 % (Alexander y Sánchez, 2002). De igual forma, la escarificación física con agua a 80 °C favoreció el porcentaje de germinación de las semillas *Pterogyne nitens* Tul ex Benth cosechadas en los años 2008 y 2011, estas fueron sembradas a temperatura constante de 30 °C durante 10 días donde mostró un 36 % de germinación (Tapia *et al.*, 2014b).

El calor húmedo es un mecanismo de liberación de latencia que puede ser explotado en el desarrollo de estrategias para poblaciones invasoras (Van Klinken y Flack, 2005). Se ha demostrado que el calor húmedo representa un excelente mecanismo para maximizar la probabilidad del establecimiento de plántulas, en especies de trópico seco como *Parkinsonia aculeata* (Van Klinken *et al.*, 2008). En la naturaleza, la exposición a altas temperaturas o cambios de temperatura es la causa más probable de la liberación de la latencia de las semillas. El primer factor ambiental crítico es el agua, la temperatura es el segundo factor importante en la germinación de la semilla (Smýkal *et al.*, 2014).

2.4. Implicaciones de la testa en la latencia

La testa es el principal determinante en la germinación de la semilla de fabáceas con testa dura. Esta capa protege al cigoto en desarrollo, además actúa como canal para la transmisión de señales ambientales al interior de la semilla. También, prepara a la semilla para ajustar su metabolismo en respuesta a cambios en su ambiente externo (Radchuk y Borisjuk, 2014). La Figura 2.4 muestra la anatomía de la testa de *Pisum sativum* (Smýkal *et al.*, 2014).

Entre otras funciones de la testa se encuentran la preservación de la integridad de las partes de la semilla, protección del embrión contra lesiones mecánicas y ataques de enfermedades, regulación de intercambio gaseoso entre el embrión y el ambiente externo y regulación de la imbibición. La

susceptibilidad a daños mecánicos está relacionada con el contenido de lignina en la testa. La longevidad y la tolerancia al tiempo en el campo depende de la integridad de la testa (Dürhben de Souza y Marcos-Filho, 2001).

El pericarpio o testa de las semillas de angiospermas produce un mucilago hidrófilo que se libera después de la hidratación y provoca la hinchazón de la semilla. Este mucilago se sintetiza en el aparato de Golgi de las células y se compone principalmente de pectinas y hemicelulosas, también pueden contener microfibrillas de celulosa o fibras celulósicas (Western, 2012).

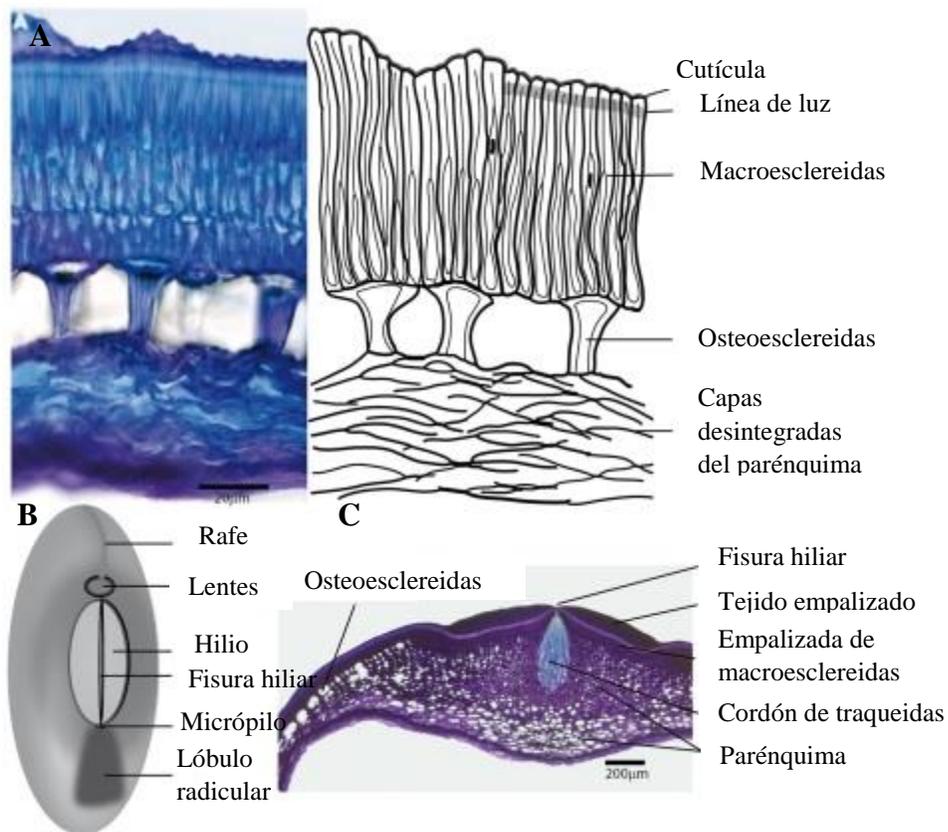


Figura 2.4. Arreglo de las estructuras de la testa de la leguminosa *Pisum sativum* (Smýkal *et al.*, 2014). **A.** Muestra el corte transversal de la testa. Las células epidérmicas se diferencian en macroesclereidas caracterizadas por una superficie cubierta de cutícula. La parte exterior de la macroesclereida está separada por una región de la pared celular. En el centro de la testa se distingue la capa osteoesclereida con una forma específica causado por el grosor de la pared celular secundaria. Las capas más internas del

parénquima se mueren en el proceso de diferenciación y sólo quedan fragmentos desintegrados. **B.** Morfología de las partes más importantes de la semilla incluyendo el hilio, la lente que se distingue en el rafe y el poro micropilar. **C.** Sección transversal de la testa en la zona del hilio. Las macroesclereidas están cubiertas con células empalizadas con una fisura central encima del cordón de traqueidas, rodeada por parénquima interconectados a los espacios celulares de la capa osteoesclereida.

El color de la testa es otro factor implicado en la latencia de las semillas. Éste es causado por la oxidación de los flavonoides, en particular por las proantocianidinas, lo que provoca un retraso en el desarrollo de la misma en *Arabidopsis thaliana*, donde el gen TT10, que se expresa en el desarrollo de la testa, está implicado en la polimerización oxidativa de los flavonoides (Pourcel *et al.*, 2005). Las testas de mutantes de *Arabidopsis*, afectadas en su pigmentación y capas estructurales, han mostrado niveles reducidos de latencia y fueron permeables a sales de tetrazolio. Sin embargo, las testas de los mutantes se deterioraron más rápido que las del tipo silvestre durante el envejecimiento natural a temperatura ambiente (Debeaujon *et al.*, 2000). En las testas de semillas dimórficas de *Halopyrum mucronatum*, los compuestos fenólicos afectan la absorción temprana de agua de las semillas y tienen influencia en la síntesis temprana de proteína.

En la testa de semillas marrón hay más polifenoles que se conservan más tiempo en medio salino, sin embargo, el porcentaje final de germinación, en medio salino, es mayor en semillas de color negro en comparación con las de color marrón (Siddiqui y Khan, 2010). Un estudio realizado en semillas de soya con testa color amarilla y negra, indica que el mayor contenido de fenoles totales, flavonoides, antocianinas, catequinas y protocatequinas lo presentaron las semillas con testa negra. Mientras que, en las testas amarillas se presentó una alta actividad enzimática de la peroxidasa dado por el gen dominante EpEp (Zilic *et al.*, 2013).

La estructura y composición química de la testa influyen en la latencia. Por ello, en semillas del género *Rubus* se estudiaron las estructuras celulares de tres genotipos, donde, *R. hoffmeisterianus* Kunth & C. D. Bouché, presentó una superficie de reticulación con endotesta compuesta de esclereidas homogéneas (grosor de testa 0.086 ± 0.003 mm), *R. occidentalis* L. mostró una

superficie altamente reticulada con meso y endotesta compuesta de esclereidas heterogéneas (grosor de testa 0.175 ± 0.004 mm) y *R. caesius* L. tuvo la testa más gruesa (0.185 ± 0.006 mm) con exotesta moderada, meso y endotesta compuestas de grandes esclereidas. *R. occidentalis* fue la especie más altamente lignificada y *R. hoffmeisterianus* presentó la mitad de proantocianidinas de la que contenía *R. occidentalis*. Por lo tanto, se adjudica que el contenido de proantocianidinas y la composición de esclereidas contribuyen a la latencia de las semillas (Wada *et al.*, 2011). El porcentaje de germinación que presentaron, previos estudios, fue de 64.5 % para *R. caesius* y nula para *R. hoffmeisterianus* Kunth & C. D. Bouché, y *R. occidentalis* (Wada, 2009).

2.4.1. Enzimas que degradan la testa de las semillas

Con el objeto de estudiar el papel de la testa en la movilización y degradación de los compuestos de reserva, galactomananos, durante y después del proceso de germinación en semillas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., semillas con y sin testa fueron puestas a imbibición. En la testa, se encontraron actividades hidrolíticas de las enzimas endo- β -mananasa y α -galactosidasa. Las semillas sin testa presentaron una anticipada movilización de proteínas y un aumento de la actividad de α -galactosidasa y degradación del galactomanano. Por lo tanto, la testa parece jugar un papel importante durante la movilización de las reservas al participar en el control de la producción, modificación y almacenamiento de las enzimas hidrolíticas (Tonini *et al.*, 2007). Después de la germinación, el galactomanano es hidrolizado por α -galactosidasa (EC 3.2.1.22), endo- β -mananasa (EC 3.2.1.78) y β -manosidasa (EC 3.2.1.25). La degradación de este polisacárido en el endospermo ocurre por el descenso del ácido abscísico (ABA) durante la movilización de las reservas después de la germinación. Por lo tanto, existe una relación entre ABA y las actividades hidrolíticas para la movilización de las reservas de almacenamiento de las semillas (Tonini *et al.*, 2006).

Otros estudios en *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*, en las estructuras testa, cotiledón y embrión demuestran la actividad de la enzima catecolasa o catalasa (E.C. 1.10.3.2). La actividad se encontró en menor nivel en el embrión y en mayor concentración en el cotiledón y la testa de la semilla. Las diferencias entre especies fueron dadas por el genotipo. Esta enzima puede tener implicaciones en la intensificación de la germinación y en aplicaciones biotecnológicas (Aniszewski, 2010).

En semillas de berro (*Lepidium sativum*), la enzima pectin metil esterasa tiene un papel crucial en la ruptura de la testa y germinación de la semilla (Scheler *et al.*, 2015). Para determinar la actividad

de las enzimas intracelulares durante la imbibición, se realizaron estudios en semillas de soya, chícharo y cacahuete, encontrándose semillas con testa intactas de las tres especies. Después de 6 h de imbibición a 25 °C, se hallaron actividades de las enzimas intracelulares del citosol (glucosa-fosfato deshidrogenasa) y enzimas del citosol y organelos (malato deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa, glutamato oxaloacetato transaminasa, y NADP-isocitrato deshidrogenasa). Las actividades en chícharo y cacahuete fueron más bajas en comparación con las de soya (Duke y Kakefuda, 1981).

2.5. Literatura citada

Alexander, J., y G. Sánchez. 2002. Efecto del tratamiento con agua caliente e imbibición sobre la germinación de semillas de *L. leucocephala*. *Revista Científica*. 12: 581-583.

Atencio, L., R. Colmenares, M. Ramírez-Villalobos, y D. Marcano. 2003. Tratamientos pregerminativos en acacia San Francisco (*Peltophorum pterocarpum*) Fabaceae. *Revista de la Facultad de Agronomía LUZ*. 20: 63-71.

Aniszewski, T. 2010. Comparison of catecholase (PPO) activity in whole seeds and their components (testa, cotyledon and embryo) of four legume species from genus *Lupinus*. *Legume Research*. 33: 157-163.

Arias, L., H. Losada, A. Rendón, D. Grande, J. Vieyra, R. Soriano, J. Rivera, and J. Cortés. 2003. Evaluation of Chipilín (*Crotalaria longirostrata*) as a forage resource for ruminant feeding in the tropical areas of Mexico. *Livestock Research for Rural Development* (15): 4. Consultado el 08 de agosto de 2015. <http://www.lrrd.org/lrrd15/4/aria154.htm>.

Azcón-Bieto, J., y M. Talón. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. pp: 435-449.

Bañuelos, P. J., M. A. Ruiz L., R. Soltero Q., y H. Castañeda V. 2006. Lupinos del Occidente de México. Estudios biológico, bioquímico y toxicológico. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. pp: 21.

Baskin, J. M., and C. C. Baskin. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*. 14: 1-16.

Batlla, D., and R. L. Benech-Arnold. 2007. Predicting changes in dormancy level in weed seed soil banks: Implications for weed management. *Crop protection*. 26: 189-197.

Benech-Arnold, R. L., R. A. Sánchez, F. Forcella, B. C. Kruk, and C. M. Ghera. 2000. Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Research*. 67: 105-122.

Bewley, J. D., K. Bradford, H. Hilhorst, and H. Nonogaki. 2013. Seeds: Physiology of development, germination and dormancy. 3rd. ed. Springer Science & Business Media. New York Heidelberg Dordrecht London. 392 p.

Bewley, J. D. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. 9: 1055-1066.

Biurrún, E., L. Galetto, A. M. Anton, y F. Biurrún. 2007. Plantas silvestres comestibles utilizadas en poblaciones rurales de la Provincia de La Rioja (Argentina). *Etnobotánica*. 33: 121-140.

Buckeridge, M. S., I. S. Hutcheon, and J. S. G. Reid. 2005. The role of exo-(1→4)-β-galactanase in the mobilization of polysaccharides from the cotyledon cell walls of *Lupinus angustifolius* following germination. *Annals of Botany*. 96: 435-444.

Buxó, R. 2008. La explotación de los vegetales como recurso alimenticio durante la prehistoria: datos y reflexiones. CPAG (Cuadernos de Prehistoria y Arqueología de la Universidad de Granada). 18: 41-54.

Castañeda, S. R., J. C. Albán, H. P. Gutiérrez, E. G. Cochachin, y M. I. A. de la Torre. 2014. Plantas silvestres empleadas como alimento para animales en Pisha, Ancash. *Ecología Aplicada*. 13: 153-168.

Chízmar, F. C. 2009. Plantas comestibles de Centroamérica. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio. Consultado el 09 de agosto de 2015. <http://www.inbio.ac.cr/>.

CONABIO. 2006. Capital natural y bienestar social. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Consultado el 08 de agosto de 2015. http://www.conabio.gob.mx/2ep/index.php/Capital_natural_y_bienestar_social.

Debeaujon, I., K. M. León-Kloosterziel, and M. Koornneef. 2000. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 122: 403-413.

Duke, S., and G. Kakefuda. 1981. Role of the testa in preventing cellular rupture during imbibition of legume seeds. *Plant Physiology*. 67: 449-56.

Dunn, D. B. 1979. Lupinus. In: Rzedowski G., y C. Rzedowski (eds.). 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. pp: 290-296.

Dürhben de Souza, F. H., and J. Marcos-Filho. 2001. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. *Revista Brasileira de Botânica*. 24: 365-375.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2014. Anuario Estadístico 2014: La alimentación y la Agricultura en América Latina y el Caribe. Santiago de Chile, Chile. 178 p. Consultado el 2 de diciembre de 2015. <http://www.fao.org/3/a-i3592s.pdf>.

Finch-Savage, W. E., and G. Leubner-Metzger. 2006. Seed dormancy and the control of germination. Review. *New Phytologist*. 171: 501-523.

Forcella, F., R. L. Benech Arnold, R. Sanchez, and C. M. Ghera. 2000. Modeling seedling emergence. *Field Crops Research*. 67: 123-139.

Fraile, M. E., M. D. García-Suárez, A. Martínez-Bernal, and R. Slomianski. 2007. Nutritivas y apetecibles: Conozca de leguminosas comestibles. Parte I. Hojas, vainas y semillas. *Contactos*. 66: 27-35.

García-López, P. M., M. Muzquiz, M. A. Ruiz-Lopez, J. F. Zamora-Natera, C. Burbano, M. Pedrosa, M. C. Cuadrado, and P. Garzón-De La Mora. 2001. Chemical composition and fatty acid profile of several mexican wild Lupins. *Journal of Food Composition and Analysis*. 14: 645-51.

González, Y., J. A. Sánchez, J. Reino, and C. Fung. 2006. Efecto de los tratamientos de hidratación-deshidratación en la emergencia y el rendimiento de *Macroptilium atropurpureum* y *Crotalaria spectabilis*. *Pastos y Forrajes*. 29: 1-8.

Graham, H. P., and P. C. Vance. 2003. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*. 131: 872-877.

Herrera, J., R. Alizaga, E. Guevara, y V. Jiménez. 2006. Germinación y crecimiento de la planta. In: Fisiología de la producción de los cultivos tropicales. Universidad de Costa Rica. pp: 18-28.

Herrera-Velazco, J. M., M. L. Isaac-Virgen, R. Rodríguez-Macías, J. F. Zamora-Natera, M. A. Ruíz-López, y P. M. García-López. 2010. Conservación del forraje de *Lupinus rotundiflorus* M. E. Jones y *Lupinus exaltatus* Zucc. mediante ensilaje. *Interciencia*. 35: 592-599.

Herrera-Velazco, J. M., P. M. García L., R. Rodríguez M., M. L. Isaac V., M. A. Ruiz L., y J. F. Zamora N. 2015. Caracterización nutricional de un ensilado de lupino (*Lupinus rotundiflorus*) con rastrojo de maíz y efecto de su inclusión en dietas para borregos pelibuey. *Interciencia*. 40: 337-342.

Izaguirre, P. 2005. Uruguay y sus recursos fitogenéticos en leguminosas. *Agrociencia*. 9: 77-83.

Jacobsen, S. E., y A. Mujica. 2006. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. pp: 458-482.

Kozłowski, T. T., and S. G. Pallardy. 1997. Seed germination and seedling growth *In*: Growth control in woody plants. Chapter 2. Science Direct. pp: 14-72.

Lagunes-Espinoza, L. C., J. López-Upton, E. García-López, J. Jasso-Mata, A. Delgado-Alvarado, y G. García de los Santos. 2012. Diversidad morfológica y concentración de proteína de *Lupinus* spp. en la región centro-oriental del estado de Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana*. 99: 73-90.

Lahuta, L. B., R. J. Górecki, D. Michalczyk, and A. I. Piotrowicz-Cieślak. 2000. Alpha-D-galactosidase activity in stored yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. *Electronic Journal of Polish Universities, Agronomy*. 3: 1-8.

Leverett, L. D., and M. Woods. 2012. The Genus *Crotalaria* (Fabaceae) in Alabama. *Southern Appalachian Botanical Society*. Castanea. 77: 364-374.

Mayer, A. M., and Y. Shain. 1974. Control of seed germination. Annual Review. *Plant Physiology*. 25: 167-93.

Melkus, G., H. Rolletschek, R. Radchuk, J. Fuchs, T. Rutten, U. Wobus, T. Altmann, P. Jakob, and L. Borisjuk. 2009. The metabolic role of the legume endosperm: A noninvasive imaging study. *Plant Physiology*. 151: 1139-1154.

Moreno, M. E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Universidad Autónoma de México. 3ra. ed. pp: 113.

Morton, J. F. 1994. Pito (*Erythrina berteroana*) and chipilin (*Crotalaria longirostrata*), (Fabaceae) two sporific vegetables of Central America. *Economic Botany*. 48: 130-138.

Nonogaki, H., F. Chen, and K. J. Bradford. 2007. Mechanisms and genes involved in germination sensu stricto. *In*: K.J. Bradford, H. Nonogaki (eds.), Seed development, dormancy and germination. Blackwell Publishing, Oxford. pp: 264-304.

Nonogaki, H., G. W. Bassel, and J. D. Bewley. 2010. Germination-still a mystery. *Plant Science*. 179: 574-581.

NRCS. Natural Resources Conservation Service. USDA. United States Department of Agriculture. 2015. Disponible en <http://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/site/national/home/>. Consultado el 09 de agosto de 2015.

Ortega-Nieblas, M., y L. Vázquez-Moreno. 1995. Caracterización fisicoquímica de los aceites crudos de algunas semillas de leguminosas del desierto sonorense. *Grasas y Aceites*. 46: 1-5.

Oliveira, P. J. A., K. E. Afif, y G. J. Ortiz. 2007. Evaluación de un método de escarificación mecánica en la germinación de semillas de leguminosas pratenses. *Pastos*. 37: 179-191.

Pablo-Pérez, M., L. C. Lagunes-Espinoza, J. López-Upton, E. M. Aranda-Ibáñez, y J. Ramos-Juárez. 2015. Composición química de especies silvestres del género *Lupinus* del estado de Puebla, México. *Revista de Fitotecnia Mexicana*. 38: 49-55.

Pío-León, J. F., G. López-Angulo, R. Vega-Aviña, J. Montes-Avila, S. P. Díaz-Camacho, and F. Delgado-Vargas. 2013. Caracterización fisicoquímica y nutricional de las semillas de *Ebenopsis caesalpinoides* (Standl.) Britton & Rose, planta nativa de Sinaloa, México. *Journal of Food*. 11: 119-126.

Pourcel, L., J. M. Routaboul, L. Kerhoas M. Caboche L. Lepiniec, and I. Debeaujon. 2005. Transparent testa10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *The Plant Cell*. 17: 2966-2980.

Radchuk, V., and L. Borisjuk. 2014. Physical, metabolic and developmental functions of the seed coat. *Frontiers in Plant Science. Plant Evolution and Development*. 5: 1-17.

Raven, P. H., R. F. Evert, and S. E. Eichhorn. 1992. *Biología de las plantas*. Vol. 2. REVERTÉ S. A. Barcelona, España. pp: 383.

Reino, J., J. A. Sánchez, B. Muñoz, Y. González, y L. Montejo. 2011. Efecto combinado de la escarificación y la temperatura en la germinación de semillas de leguminosas herbáceas. *Pastos y Forrajes*. 34: 179-184.

Ruiz, L. M. A., M. R. Rodríguez, y P. S. Navarro. 2006. Evaluación químico-nutricional de *Lupinus exaltatus* Zucc, del nevado de Colima, México, como fuente potencial de forraje. *Interciencia*. 31: 758-761.

Ruiz, M. J. J., L. M. M. Ruiz, y N. J. F. Zamora. 2000. The genus *Lupinus*: Taxonomy and distribution in Jalisco. Mexico. E. van Santen E, Wink M, Roemer P (eds.) *Lupin, an ancient crop for the New Millenium*. Proceedings. 9th VIII International. Lupin Conference. Klink/Müritz, Alemania, 24/06/1999. pp: 297-300.

Sanabria, D., R. Silva-Acuña, M. Oliveros, y U. Manrique. 2004. Germinación de semillas de las leguminosas arbustivas forrajeras *Cratylia argentea* y *Cassia moschata* sometidas a inmersión en ácido sulfúrico. *Bioagro*. 16: 225-230.

Scheler, C., K. Weitbrecht, S. P. Pearce, A. Hampstead, A. Büttner-Mainik, K. J. D. Lee, A. Voegele, K. Oracz, B. J. W. Dekkers, X. Wang, A.T. A. Wood, L. Bentsink, J. R. King, J. P. Knox, M. J. Holdsworth, K. Müller, and G. Leubner-Metzger. 2015. Promotion of testa rupture during

garden cress germination involves seed compartment-specific expression and activity of pectin methylesterases. *Plant Physiology*. 167: 200-215.

Siddiqui, Z. S., and M. A. Khan. 2010. The role of seed coat phenolics on water uptake and early protein synthesis during germination of dimorphic seeds of *Halopyrum mucronatum* (L.) Staph. *Pakistan Journal of Botany*. 42: 227-238.

Silveira, R. M. B., S. Monereo M., y B. Molina B. 2003. Alimentos funcionales y nutrición óptima: ¿Cerca o lejos? *Revista Española de Salud Pública*. 77: 317-331.

Smýkal, P., V. Vernoud, M. Blair, A. Soukup, and R. Thompson. 2014. The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science*. 5: 1-19.

Tapia, A. M., A. Romero, V. Luque, P. Gervasoni, S. Aybar, A. Lobo Furque, y I. Gomez. 2014a. Diferentes técnicas de escarificación en la germinación de semillas de *Sesbania punicea*. *Revista agronómica del noroeste argentino*. 34: 54-55.

Tapia, A. M., A. Romero, V. Luque, P. Gervasoni, S. Aybar, A. Lobo Furque, y I. Gomez. 2014b. Influencia de la escarificación física en la germinación de semillas de tipa colorada (*Pterogyne nitens* Tul ex Benth). *Revista agronómica del noroeste argentino*. 34: 58-59.

Tena, M., R. Ávila, y S. Bahuchet. 2012. Los mercados de Guadalajara, México. Ejemplo del consumo de plantas silvestres. *Revista de Humanidades*. 18: 169-191.

Tonini, P. P., C. G. S. Lisboa, C. O. Silva, S. C. Mazzoni-Viveiros, and M. S. Buckeridge. 2007. Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. *Trees*. 21: 13-21.

- Tonini, P. P., C. G. S. Lisboa, L. Freschi, H. Mercier, S. C. Mazzoni-Viveiros, and M. S. Buckeridge. 2006. Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and endo- β -mannanase activity in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (*Leguminosae*). *Trees*. 20: 669-678.
- Tosh, S. M., and S. Yada. 2010. Dietary fibres in pulse seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications. *Food Research International*. 43: 450-460.
- Valencia-Díaz, S., A Flores-Morales, A. Flores-Palacios, and I. Perea-Arango. 2015. How does the presence of endosperm affect seed size and germination? *Botanical Sciences*. 93: 783-789.
- Van Klinken, R. D., B Lukitsch, and C. Cook. 2008. Interaction between seed dormancy-release mechanism, environment and seed bank strategy for a widely distributed perennial legume, *Parkinsonia aculeata* (Caesalpinaceae). *Annals of Botany*. 102: 255-264.
- Van-Klinken, R. D., and L. Flack. 2005. Wet heat as a mechanism for dormancy release and germination of seeds with physical dormancy. *Weed Science*. 53: 663-669.
- Wada, S. 2009. Evaluation of *Rubus* seed characteristics: Seed coat morphology, anatomy, germination requirements and dormancy breaking. Tesis Doctoral. Oregon State University. United States of America. pp: 91-98.
- Wada, S., J. A. Kennedy, and B. M. Reed. 2011. Seed-coat anatomy and proanthocyanidins contribute to the dormancy of *Rubus* seed. *Scientia Horticulturae*. 130: 762-768.
- Western, T. 2012. The sticky tale of seed coat mucilages: Production, genetics, and role in seed germination and dispersal. *Seed Science Research*. 22: 1-25.
- Williams, M., and R. Molyneux. 1987. Occurrence, concentration, and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. *Weed Science*. 35: 476-481.

Wolko, B., J. C. Clements, B. Naganowska, M. N. Nelson, and H. Yang. 2011. *Lupinus*. In: Wild crop relatives: Genomic and breeding resources, legume crops and forages. Kole, C. (ed.). Berlin, Heidelberg: Springer. pp: 153.

Zilic, S., H. Gül, A. Serpen, V. Peric, and V. Gökmen. 2013. Comparisons of phenolic compounds, isoflavones, antioxidant capacity and oxidative enzymes in yellow and black soybeans seed coat and dehulled bean. *European Food Research and Technology*. 237: 409-418.

CAPÍTULO III

EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL PORCENTAJE, VELOCIDAD DE GERMINACIÓN Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SEMILLAS DE *Crotalaria longirostrata* Y *Lupinus exaltatus*

3.1. RESUMEN

Se estudió el porcentaje (PG), velocidad de germinación (VG) y actividad enzimática específica de β -1,3-glucanasa, β -glucosidasa, α -D-galactosidasa y α -amilasa en semillas de *Crotalaria longirostrata* y *Lupinus exaltatus* en cuatro regímenes de temperatura (día/noche): 20 °C/15 °C, una semana a 5 °C seguido por ciclos de 20 °C/20 °C, 30 °C/20 °C y una temperatura constante de 25 °C. Lotes triplicados de semillas, previamente desinfectados, fueron puestos a germinar en cámaras de crecimiento con fotoperiodo de 12 h durante 5, 10, 15 y 20 días. La actividad enzimática específica de β -1,3-glucanasa, β -glucosidasa, α -D-galactosidasa y α -amilasa se determinó a partir de extractos enzimáticos obtenidos a los 5, 10, 15 y 20 días después de siembra (dds) usando los sustratos artificiales Laminarina, p-nitrofenol β -D-glucopiranosido, p-nitrofenol α -D-galactopiranosido y almidón, respectivamente. En *L. exaltatus*, las medias más altas de PG y VG (25.92 % y 0.68 semillas día⁻¹) se presentaron en el régimen de 25 °C constante y en *C. longirostrata*, en los regímenes de 25 °C constante y 30 °C/20 °C aunque los PG fueron muy bajos (5.69 y 6.11 % respectivamente). Los regímenes de temperatura tuvieron un efecto altamente significativo sobre la actividad de α -D-galactosidasa en ambas especies y en β -glucosidasa sólo en la especie *C. longirostrata*. Las enzimas β -1,3-glucanasa y α -amilasa no mostraron actividad durante el periodo de germinación. No se observó una relación positiva entre PG y actividad enzimática de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa. En *L. exaltatus*, la mayor actividad de α -D-galactosidasa se observó desde los 5 dds en los regímenes más fríos, mientras que, β -glucosidasa mostró la mayor actividad (280.2 U/mg de proteína total) en la temperatura 30 °C/20 °C a los 15 dds. En *C. longirostrata*, la α -D-galactosidasa mostró una mayor concentración a los 15 dds en la temperatura 20 °C/15 °C (20 357.8 U/mg de proteína total) y β -glucosidasa a los 10 dds en la temperatura de 20 °C/15 °C (630.5 U/mg de proteína total).

Palabras clave: Fabáceas, regímenes de temperatura, germinación, enzimas.

3.2.INTRODUCCIÓN

Las leguminosas son componentes indispensables en los ecosistemas y sistemas de cultivo por los servicios ambientales que proporcionan, entre ellos, la capacidad biológica de fijar nitrógeno. Sus semillas son ricas en minerales como el Fe y Zinc, más que los cereales (Lizarazo *et al.*, 2015) y contribuyen con un tercio de la proteína consumida por la población humana. Desempeñan un papel vital en la seguridad alimentaria y en la resiliencia al cambio climático (Chee *et al.*, 2014). En México, constituyen la segunda familia más grande de plantas fanerógamas (Sousa y Delgado, 1998) y menos del 20 % de éstas son explotadas como fuente de alimento para el consumo humano o animal, por lo que aún, un alto porcentaje están semidomesticadas o son silvestres (Fraile *et al.*, 2007). Aunado a lo anterior, la mayoría de las semillas de las leguminosas no germinan, aunque se encuentren en condiciones ambientales favorables debido a la impermeabilidad de la testa. De acuerdo a Gama-Arachchige *et al.* (2013), una capa impermeable de células de empalizada localizada en la testa, entre otros factores, es causa de latencia física.

Entre los factores que pueden influir en la liberación de la latencia para la germinación de la semilla, están las fluctuaciones o alternancia de temperaturas (Luzia *et al.*, 2015). Se ha observado que las leguminosas de estación cálida tienen mayor porcentaje de germinación a 25 °C y las de estación fría a 20 °C (Butler *et al.*, 2015). El utilizar umbrales de temperatura para la liberación de latencia de las semillas puede mejorar la persistencia de los bancos de semillas, la resistencia al fuego, al cambio climático y al manejo antropogénico (Ooi *et al.*, 2014). En condiciones naturales, en los ecosistemas propensos a incendios, el calor producido en el suelo es el mayor estímulo para romper la latencia. Sin embargo, la liberación de la latencia no es uniforme en todas las semillas y a menudo se observan variaciones intrapoblacionales, lo que al mismo tiempo es una ventaja para la persistencia de una especie en entornos impredecibles. También, se han observado variaciones entre especies como una consecuencia del efecto de la temperatura en la germinación. Mientras que, algunas especies pueden germinar a bajas temperaturas, otras restringen la germinación a temperaturas ocasionadas por incendios severos (Liyanage y Ooi, 2015). Pero las temperaturas presentes durante la primera fase del proceso germinativo afectan la imbibición, este efecto es más severo cuando la toma de agua ocurre a bajas temperaturas ya que se dañan las membranas celulares (Bewley *et al.*, 2013).

La sensibilidad de las semillas a la permeabilidad de la testa aumenta con el tiempo de exposición de la temperatura (Gama-Arachchige *et al.*, 2012), lo que también influye en la velocidad de la germinación. En el caso de *Diptychandra aurantiaca*, las temperaturas de 25 y 30 °C no sólo promovieron la germinación sino también potenciaron la velocidad (Morbeck *et al.*, 2013).

Una vez liberadas las semillas de la latencia física, se produce el proceso de germinación. Esta tiene un efecto sobre la composición y distribución de los nutrientes. En semillas de soya se han observado cambios en el contenido de proteína total y ácidos grasos a diferentes temperaturas de germinación. En régimen de temperatura de 25 °C, se incrementó el contenido de proteína, pero se redujo el total de ácidos grasos (Cheol *et al.*, 2015). Al incrementarse el contenido proteico por efecto de temperatura, podría también incrementarse la actividad enzimática (Nkang, 2002). Polisacáridos de la familia de mananos, xiloglucanos y galactanos presentes en forma de reservas de almacenamiento, al ser hidrolizados se utilizan como fuente de energía inmediata durante las etapas tempranas de la germinación. Los mananos están subdivididos en mananos, glucomananos y galactomananos (Buckeridge *et al.*, 2000a; Buckeridge, 2010; Prajapati *et al.*, 2013). Durante la fase de expansión de la radícula se activan diversas enzimas glucósido hidrolasas y transglucosidasas que degradan estos polisacáridos de la pared celular, las que también están implicadas en la biosíntesis y remodelación de glicanos y movilización de energía (Minic, 2008). La movilización del polisacárido galactomanano empieza durante las fases tempranas de la germinación y las enzimas implicadas en la hidrólisis son endo- β -mananasas, α -D-galactosidasas y α -D-manosidasas (Buckeridge *et al.*, 2000b). Se han detectado niveles elevados de α -D-galactosidasas durante el periodo de imbibición de la semilla de *Euphorbia heterophylla* L., lo que parece estar relacionado con la reducción de la resistencia del endospermo a la expansión del cotiledón (Suda *et al.*, 2003).

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes regímenes de temperatura sobre el porcentaje y velocidad de germinación, y la actividad enzimática específica de β -1,3-glucanasa, β -glucosidasa, α -D-galactosidasa y α -amilasa en las leguminosas *Crotalaria longirostrata* y *Lupinus exaltatus*.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Material biológico

Frutos secos y maduros de *Lupinus exaltatus* fueron recolectados en la Región de los Valles de Serdán y Libres en el estado de Puebla durante el mes de agosto de 2014; el beneficio de semillas se realizó en el Laboratorio Forestal del CP-Campus Montecillo; los frutos de *Crotalaria longirostrata* se recolectaron en Macuspana, Tabasco en 2013. Las semillas se colocaron en bolsas de papel etiquetadas y fueron transportadas al Laboratorio de Fisiología Vegetal del Campus Tabasco. En el laboratorio se contabilizaron las semillas sanas y se conservaron a 4 °C en frascos de plástico para su posterior análisis.

3.3.2. Desinfección de semillas

Las semillas fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 2 min, y enseguida se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, previo a la aplicación de tratamientos.

3.3.3. Prueba de viabilidad

Previo a la aplicación de tratamientos se realizó la prueba de viabilidad a las semillas de ambas especies. Lotes triplicados de 20 semillas por especie, se desinfectaron, escarificaron mecánicamente y pusieron a imbibir durante dos h a temperatura ambiente para separar la testa de los cotiledones. Los cotiledones se sumergieron en 5 mL de solución de 2, 3, 5-trifenil cloruro de tetrazolio (Sigma, código T8877) al 1 %. En oscuridad se dejaron reposar 24 h, posteriormente se contaron los embriones que fueron teñidos de rojo para obtener el porcentaje de semillas viables (ISTA, 2010).

3.3.4. Regímenes de temperatura de germinación

Lotes triplicados de 30 y 50 semillas de *C. longirostrata* y de 20 y 35 semillas de *L. exaltatus*, previamente desinfectados, fueron sembrados en cajas Petri entre papel absorbente estéril y colocados en cámaras de crecimiento (Lumistell modelo ICP-19 y Thermo Scientific modelo 818) programadas con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad (Acosta-Percástegui y Rodríguez-Trejo, 2005; Gutierrez-Nava, 2010), para evaluar el efecto de la temperatura sobre el porcentaje (PG), velocidad de germinación (VG) y actividad enzimática a los 5, 10, 15 y 20 días después de siembra (dds). Los regímenes de temperaturas (día/noche) aplicados durante la germinación

fueron: **1)** 20 °C/15 °C, **2)** una semana a 5 °C seguido de ciclos de 20 °C/20 °C, **3)** 30 °C/20 °C y **4)** temperatura constante de 25 °C.

Durante el periodo de germinación, todos los lotes de semillas fueron regados diariamente con agua destilada estéril a temperatura ambiente.

3.3.5. Determinación del porcentaje y velocidad de germinación

El porcentaje de germinación (PG) corresponde a la relación entre el número de semillas germinadas y el número de semillas sembradas y se determinó con la fórmula (Scott *et al.*, 1984):

$$PG (\%) = \frac{NTSG}{NTSS} \times 100$$

donde NTSG = Número total de semillas germinadas,

NTSS = Número total de semillas sembradas.

Para la prueba de germinación, se realizó un conteo diario considerando germinada una semilla cuando la radícula tenía una longitud ≥ 2 mm.

La velocidad de germinación (VG) es definida como la medida del número de semillas germinadas en relación con el tiempo de germinación y se determinó con la fórmula:

$$VG = \frac{\sum(n_i)}{t}$$

donde n_i = Número de semillas germinadas en día i ;

t = Tiempo de germinación desde la siembra hasta la germinación de la última semilla.

3.3.6. Determinación de la actividad enzimática de β -glucosidasa, α -D-galactosidasa, β -1,3-glucanasa y α -amilasa

3.3.6.1. Obtención del extracto crudo enzimático a partir de polvos secos de acetona

El extracto crudo enzimático a partir de los polvos de acetona (PDA) fue preparado de acuerdo a Gerardi *et al.*, 2001 con algunas modificaciones, como se menciona a continuación. Muestras por triplicado de cada tratamiento, con peso promedio de 0.484 ± 0.01 g y 0.475 ± 0.03 g en *C. longirostrata* y *L. exaltatus* respectivamente, se colocaron en morteros enfriados y se les adicionó N_2 líquido para su molido homogéneo. Posteriormente, se desengrasaron con hexano al 95 %

relación 1:10 (p/v), en agitación constante a 150 rpm por dos h a 4 °C, y se centrifugaron a 10 000 rpm por cinco min a 4 °C. El sobrenadante se decantó y el precipitado se dejó una h en reposo hasta la evaporación completa del solvente. Enseguida, se realizaron tres extracciones sucesivas con acetona al 80 % relación 1:3 (p/v), homogenizando la muestra y centrifugando entre cada una a 5 000 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante fue desechado. Para terminar, se realizó una extracción con acetona al 100 % relación 1:3 (p/v) a 10 000 rpm por 5 min a 4 °C, desechando el sobrenadante, y el residuo se dejó a temperatura ambiente hasta la evaporación completa del solvente. La pasta resultante fue molida hasta su pulverizado homogéneo y conservado a -67 °C. El extracto crudo enzimático fue obtenido a partir de 15 mg de PDA a los que se les adicionaron 30 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) (Sigma) y 900 µL de Triton X100 (Sigma) al 1 % en una solución de 100 mM pH 7.0 de regulador Tris ultrapure (Invitrogen). Todo se incubó a 37 °C en baño maría por 30 min en agitación constante a 150 rpm; posteriormente fueron centrifugados a 10 000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para la determinación enzimática de β -1,3-glucanasa y β -glucosidasa en ambas especies; α -amilasa sólo en *L. exaltatus*.

3.3.6.2. Obtención del extracto crudo enzimático con regulador de acetato de sodio

El extracto crudo enzimático con regulador de acetato de sodio fue preparado de acuerdo a Fialho *et al.*, 2008 con algunas modificaciones, como se mencionan a continuación. Muestras por triplicado de cada tratamiento, con peso promedio de 0.301 ± 0.01 g y 0.271 ± 0.01 g en *C. longirostrata* y *L. exaltatus* respectivamente, se colocaron en morteros fríos y se les adicionó N₂ líquido para su molido homogéneo, posteriormente, se adicionaron 20 mL de regulador de acetato de sodio trihidratado grado ACS (Fermont) 15 mM a pH 5.5 y se homogenizaron. El homogenizado fue centrifugado a 4 °C a 10 000 rpm durante cinco min. El sobrenadante fue decantado y almacenado a -67 °C para la determinación posterior de la actividad enzimática de α -D-galactosidasa en ambas especies; α -amilasa sólo en *C. longirostrata*.

3.3.7. Actividad enzimática de β -glucosidasa

La actividad de β -glucosidasa se determinó según Ross *et al.* (1993) y Gerardi *et al.* (2001). 200 µL del extracto enzimático, se mezclaron con 200 µL de regulador acetato de sodio 125 mM pH 4.0, que contenía 2- β -mercaptoetanol 200 mM, 50 µL de p-nitrofenol β -D-glucopiranosido (Sigma, código 101331364) 40 mM y 350 µL de agua desionizada estéril en un volumen final de 1000 µL.

Todo se mezcló en vortex y se incubó a 30 °C durante 60 min. La reacción se detuvo con la adición de 200 µL de carbonato de sodio anhidro (Na₂CO₃) 1 M. En las muestras testigos, la reacción enzimática se detuvo antes de la incubación. La absorbancia se midió a 405 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific modelo Multiskan Go. La curva patrón se elaboró usando p-nitrofenol (Sigma, código 1001837652) como estándar a una concentración de 0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, y 10000 µM. Los resultados se expresaron en actividad enzimática específica, misma que se representa como las Unidades de enzima liberadas por mg de proteína total. Una unidad de β-glucosidasa fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar un µM de p-nitrofenol por minuto.

3.3.8. Actividad enzimática de α-D-galactosidasa

La actividad se realizó de acuerdo a Fialho *et al.* (2008). Se determinó usando 100 µL de extracto enzimático, 600 µL de regulador de acetato de sodio 200 mM pH 5.0 y 50 µL de sustrato p-nitrofenol α-D-galactopiranosido 20 mM (Sigma, código 101457839) en un volumen final de 1000 µL. La reacción se llevó a cabo durante 15 min a 40 °C y se detuvo con la adición de 250 µL de Na₂CO₃ 2 M. En las muestras testigos, la reacción se detuvo antes de la incubación. Posteriormente, se centrifugó a 10 000 rpm durante cinco min a temperatura ambiente. Para los testigos, la reacción enzimática se detuvo antes de la incubación. Finalmente, se realizó una curva patrón de p-nitrofenol (Sigma, código 1001837652) a una concentración de 0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 y 10000 µM para interpolar los datos. La cantidad de p-nitrofenol liberado se midió a una absorbancia de 410 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific modelo Multiskan Go. Los resultados se expresaron en actividad enzimática específica, misma que se representa como las Unidades de enzima liberadas por mg de proteína total. Una unidad de α-D-galactosidasa fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar un µM de p-nitrofenol por minuto.

3.3.9. Actividad enzimática de β-1,3-glucanasa

La reacción enzimática fue determinada con Laminarina (Sigma, código 1001619715) como sustrato. A 100 µL de extracto enzimático, se le agregaron 50 µL de una solución al 10 % (p/v) de Laminarina disueltos en regulador de acetato de sodio 100 mM pH 5.0 (Mauch *et al.*, 1984), 100 µL de acetato de sodio 1 M pH 5.0; y se llevó a un volumen final de 1000 µL con agua desionizada

estéril. La reacción se incubó durante 30 min a 50 °C y se detuvo con la adición de 300 µL de ácido 3, 5 dinitrosalicílico (DNS) (Bello *et al.*, 2006) y 10 min de ebullición. Para las muestras testigos se siguió el mismo procedimiento sólo que la reacción enzimática se detuvo antes de la incubación. La curva patrón se elaboró usando glucosa, de la cual se prepararon las concentraciones de 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 µg/µL de glucosa. La absorbancia de la curva y de la mezcla de reacción de muestras y testigos se determinó a 540 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific modelo Multiskan Go. Los resultados de actividad específica se expresaron en Unidades de enzima liberadas por mg de proteína total. Una unidad de actividad enzimática de β-1,3-glucanasa fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar un µM de glucosa por minuto.

3.3.10. Actividad enzimática de α-amilasa

La actividad se determinó por el método de Baker (1991) y Bernfeld (1991) modificado por Dehghanpour *et al.* (2011). A 100 µL de extracto enzimático, se le adicionaron 300 µL de una solución al 1 % de almidón (Sigma) en regulador de fosfato de potasio 100 mM pH 7.2 (fosfato de potasio dibásico K₂HPO₄ 100 mM + fosfato de potasio monobásico KH₂PO₄ 100 mM) (Sambrook y Russell, 2001) y se llevó a un volumen final de 1000 µL con agua desionizada estéril. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 30 min. Al término, se colocó en baño maría durante 10 min en ebullición para detener la reacción enzimática. Las muestras testigos fueron puestas a ebullición antes de ser incubadas. Todas las muestras, se dejaron enfriar y a partir del hidrolizado se determinaron los azúcares reductores generados con el kit GAGO 20 (Sigma, código 1002023091), siguiendo las recomendaciones del fabricante y usando glucosa para la curva patrón. La absorbancia se leyó inmediatamente a 540 nm. Los resultados se expresaron en actividad enzimática específica, misma que se representa como las Unidades de enzima liberadas por mg de proteína total. Una unidad de actividad enzimática de α-amilasa fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar un µM de glucosa por minuto.

3.3.11. Proteína total

La concentración de proteína total se determinó por el método de Micro Markwell (Markwell *et al.*, 1978) adicionando en tubos de vidrio, 300 µL de muestra (20 µL del extracto enzimático y 280 µL de agua desionizada estéril). En el extracto PDA, los 20 µL se tomaron a partir de una dilución

1:4. En agitación, se agregaron 1000 μL de una solución compuesta por: **A** [solución al 2 % de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3) J. T. Baker, 0.4 % de hidróxido de sodio ACS (NaOH) Fermont, 0.16 % de tartrato de sodio y potasio ACS ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) Fermont, 1 % de sulfato dodecil de sodio ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$), J.T. Baker], más solución **B** [solución 1:100 p/v de sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ACS, Fermont]. La mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Al terminar, en agitación, se agregaron 100 μL Folin & Ciocalteu's (Merck, código HC097873): agua en proporción 1:1. Posteriormente, se incubó durante 45 min a 37 °C. Los péptidos liberados durante la reacción se midieron a 660 nm, usando albúmina sérica bovina (Sigma código A2153) para la curva patrón a una concentración de 0 a 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.3.12. Azúcares reductores

Para cuantificar los azúcares reductores generados del hidrolizado de la enzima α -amilasa se utilizó el kit Gago 20 (Sigma, código 1002023091) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se tomaron 250 μL del hidrolizado, 500 μL de la solución de ensayo (o-dianisidina y glucosa oxidasa/peroxidasa) y se incubaron a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo al añadir 500 μL de ácido sulfúrico 12 N, se mezcló en un vortex. Finalmente, se realizó una curva patrón usando glucosa a una concentración de 0, 20, 40 y 60 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La absorbancia se leyó a 540 nm.

3.3.13. Análisis estadístico

Los datos de PG fueron transformados a la raíz cuadrada del arcoseno para tener una distribución normal aproximada de los porcentajes y junto con los datos de VG y actividad enzimática específica de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa, fueron sometidos, por especie, a un análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar en arreglo factorial donde el primer factor fue el régimen de temperatura de germinación con 4 niveles (20 °C/15 °C, 5 °C 7 días + 20 °C/20 °C, 30 °C/20 °C y 25 °C constante) y el segundo factor el tiempo de germinación con 4 niveles (5, 10, 15 y 20 días) y sus interacciones. Pruebas de medias de Tukey fueron aplicadas para distinguir diferencias entre los tratamientos utilizando el programa estadístico SAS 9.3.

En la Figura 1 de los anexos, se muestra el diagrama de flujo de las actividades metodológicas realizadas en los experimentos.

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Porcentaje y velocidad de germinación

Las semillas de ambas especies mostraron una viabilidad de $93.3 \pm 5.7 \%$ y $90.0 \pm 5.0 \%$ para *C. longirostrata* y *L. exaltatus*, respectivamente. El PG y VG de las semillas de *L. exaltatus* y *C. longirostrata* fueron afectados ($p \leq 0.05$) por los regímenes de temperatura aplicados, aunque el grado de respuesta fue diferente entre especies (Cuadro 3.1). El factor temperatura mostró un efecto significativo ($p \leq 0.0001$) en PG y VG en *L. exaltatus* y el factor tiempo mostró el efecto inverso, siendo significativo ($p \leq 0.01$) para PG en *C. longirostrata*. El efecto de la interacción régimen de temperatura por días de germinación fue no significativo en ambas especies.

Cuadro 3.1. Análisis de varianza del efecto de temperatura, tiempo de germinación y su interacción para el porcentaje y velocidad de germinación de *C. longirostrata* y *L. exaltatus*.

Fuente de variación	Grados de libertad (gL)	Cuadrado medio	
		Porcentaje de germinación (%)	Velocidad de germinación (semillas día ⁻¹)
<i>C. longirostrata</i>			
Temperatura (T)	3	0.044 **	0.044*
Días a germinación (DG)	3	0.060 ***	0.036 ns
T*DG	9	0.007 ns	0.014 ns
Error	80	0.006	0.016
<i>L. exaltatus</i>			
Temperatura (T)	3	0.499 ***	1.322 ***
Días a germinación (DG)	3	0.058 *	0.417 **
T*DG	9	0.001 ns	0.065 ns
Error	80	0.015	0.059

ns: no significativo; * ($p \leq 0.05$); ** ($p \leq 0.01$); *** ($p \leq 0.0001$).

El mayor PG y VG promedio (25.92% y 0.68 semillas día⁻¹, respectivamente) fue observado en el régimen de temperatura constante de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ para *L. exaltatus* (Figura 3.1), seguida del régimen de $20 \text{ }^\circ\text{C}/15 \text{ }^\circ\text{C}$. Las temperaturas más cálidas o el pre-acondicionamiento de $5 \text{ }^\circ\text{C}$ por siete días seguido de un régimen de temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}/20 \text{ }^\circ\text{C}$ no estimularon la germinación en esta especie. En contraste, *C. longirostrata* presentó los mayores porcentajes de germinación en la

temperatura constante de 25 °C y el régimen 30 °C/20 °C, aunque el PG fue muy bajo (5.69 y 6.11 %, respectivamente).

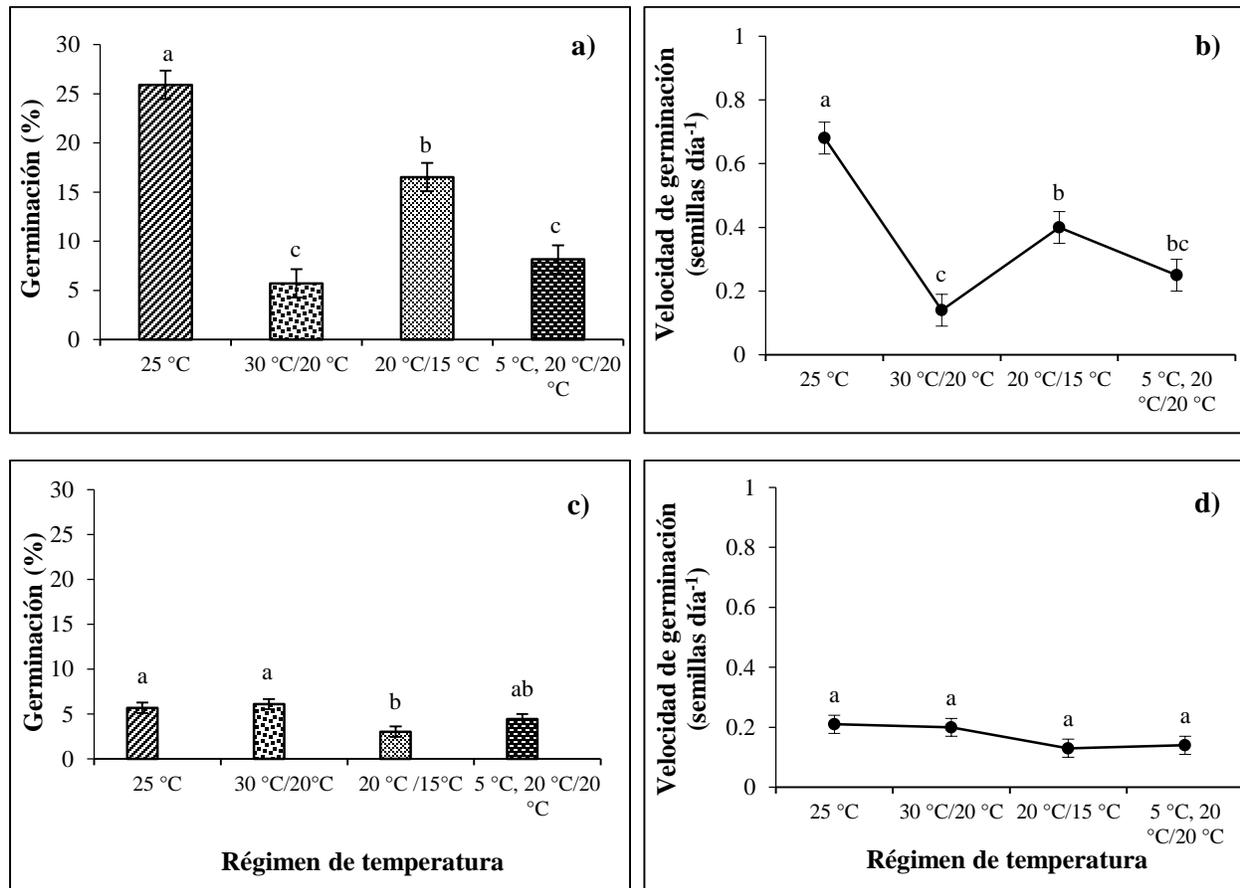


Figura 3.1. Porcentaje y velocidad de germinación promedio de semillas de *L. exaltatus* (a, b) y *C. longirostrata* (c, d) en cuatro regímenes de temperatura (25 °C constante, 30 °C/20 °C, 20 °C/15 °C y 5 °C 7 días + 20 °C/20 °C). Letras diferentes por especie y temperatura son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

La respuesta a germinación en ambas especies reflejó el origen de las mismas. Temperaturas intermedias a moderadamente frías para *L. exaltatus* y más cálidas para *C. longirostrata*. En el Cuadro 3.2 se presenta el PG y la VG durante el tiempo de germinación en ambas especies. El PG que se presenta es acumulado. A medida que transcurrió el tiempo, el PG se incrementó de manera lenta en aquellos regímenes de temperatura donde la germinación fue baja, tal vez porque las semillas presentan una testa dura lo que ocasiona una baja permeabilidad al agua, y conforme

transcurrió el tiempo de siembra y la exposición al agua a través del riego diario, la testa se fue reblandeciendo y un porcentaje de semillas logró completar el proceso de germinación.

Cuadro 3.2. Efecto del régimen de temperatura y el tiempo de germinación sobre el porcentaje (PG) y velocidad de germinación (VG) en *L. exaltatus* y *C. longirostrata*.

	Temperatura	Tiempo (días después de siembra)			
		5	10	15	20
<i>L. exaltatus</i>					
PG (%)	25 °C	19.17abcde	24.17abc	27.86ab	32.50a
	30 °C/20 °C	3.45f	5.36ef	6.31ef	7.74def
	20 °C/15 °C	11.31cdef	15.36bcdef	18.57abcde	20.83abcd
	5 °C, 20 °C/20 °C	6.07ef	7.98def	9.29def	9.29def
VG (semillas día ⁻¹)	25 °C	1.07a	0.68ab	0.53bc	0.45bc
	30 °C/20 °C	0.17c	0.15c	0.12c	0.12c
	20 °C/15 °C	0.57bc	0.40bc	0.33bc	0.28bc
	5 °C, 20 °C/20 °C	0.40bc	0.27bc	0.20bc	0.15c
<i>C. longirostrata</i>					
PG (%)	25 °C	4.00abc	5.44abc	5.78abc	7.56ab
	30 °C/20 °C	2.89abc	6.67abc	6.67abc	8.22a
	20 °C/15 °C	2.22bc	2.89abc	3.27abc	3.78abc
	5 °C, 20 °C/20 °C	1.00c	4.78abc	6.00abc	6.00abc
VG (semillas día ⁻¹)	25 °C	0.33a	0.22a	0.16a	0.15a
	30 °C/20 °C	0.20a	0.27a	0.18a	0.17a
	20 °C/15 °C	0.20a	0.13a	0.10a	0.08a
	5 °C, 20 °C/20 °C	0.10a	0.18a	0.16a	0.12a

Letras diferentes por especie y variable son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

En *L. exaltatus*, el mayor PG fue de 32.50 % en la temperatura constante de 25 °C a los 20 dds. Y en el régimen de temperatura de 20 °C/15 °C, esta especie presentó un PG acumulado de 20.83 % a los 20 dds. En cambio, la más alta VG se observó en el régimen de temperatura constante de 25 °C a los 5 dds con 1.07 semillas día⁻¹. A este tiempo, el PG era de 19.17 % en esta temperatura. En contraste, las semillas de *C. longirostrata* presentaron el mayor PG acumulado en el régimen de temperatura 30 °C/20 °C a los 20 dds aunque fue de 8.22 %. En esta especie la VG fue también muy baja durante el periodo de germinación.

En ambas especies, la VG disminuyó con el tiempo de germinación. Aún cuando las temperaturas intermedias y moderadamente frías incrementaron el PG y VG en *L. exaltatus*, a los 20 dds el porcentaje de semillas con testa dura fue de 67.5 % y 79.2 % en los regímenes de temperatura 25 °C constante y 20 °C/15 °C, respectivamente, indicando una baja permeabilidad de la testa en la mayoría de las semillas. Pero la permeabilidad de la testa de *C. longirostrata* fue aún más baja, ya que a los 20 dds el porcentaje de semillas con testas duras fue de 91.7 % en el régimen de temperatura de 30 °C/20 °C.

3.4.2. Efecto de los regímenes de temperatura sobre la actividad enzimática específica de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa

Dado que no se detectó actividad de las enzimas α -amilasa y β -1,3-glucanasa durante el periodo de germinación, por lo que no se pudo evaluar el efecto de temperatura sobre las mismas, por ello sólo se muestran los resultados de la actividad de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa.

La actividad enzimática específica de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en semillas sometidas a los cuatro regímenes de temperatura se evaluó a los 5, 10, 15 y 20 dds. El factor régimen de temperatura tuvo un efecto significativo ($p \leq 0.0001$) sobre la actividad enzimática de α -D-galactosidasa en ambas especies; y sobre β -glucosidasa fue significativo ($p \leq 0.0001$) sólo en *C. longirostrata* (Cuadro 3.3). La interacción régimen de temperatura x tiempo de germinación fue significativa para β -glucosidasa ($p \leq 0.0001$) y α -D-galactosidasa ($p \leq 0.01$) en *C. longirostrata*; en *L. exaltatus* la interacción fue significativa ($p \leq 0.0001$) para la actividad de la enzima β -glucosidasa.

No se observó efecto por tiempo de germinación para α -D-galactosidasa en ambas especies. Sin embargo, para β -glucosidasa fue significativo ($p \leq 0.05$) en *L. exaltatus*. La interacción régimen de temperatura x días de germinación se muestra en la Figura 3.2. La mayor actividad de la enzima α -D-galactosidasa se observó desde los 5 dds en los regímenes de temperaturas más frías 20 °C/15 °C y el pre-tratamiento de 5 °C seguido de régimen de 20 °C/20 °C en *L. exaltatus*.

Cuadro 3.3. Análisis de varianza para la actividad enzimática específica por efecto de temperatura durante la germinación de semillas de *L. exaltatus* y *C. longirostrata*.

Fuente de variación	Grados de libertad (gL)	Cuadrado medio	
		α -D-galactosidasa (U/mg proteína total)	β -glucosidasa (U/mg proteína total)
<i>L. exaltatus</i>			
Temperatura (T)	3	92 501 513 ***	2 467 *
Días a germinación (DG)	3	507 639 ns	2 146 *
T*DG	9	461 158 ns	7 483 ***
Error	32	404 362	610
<i>C. longirostrata</i>			
Temperatura (T)	3	100 753 129 ***	41 705 ***
Días a germinación (DG)	3	9 122 553 ns	2 825 ns
T*DG	9	15 980 191 **	12 244 ***
Error	32	3 373 511	1 324

ns: no significativo; * ($p \leq 0.05$); ** ($p \leq 0.01$); *** ($p \leq 0.0001$).

En el régimen de temperatura constante de 25 °C, donde se observó el mayor PG en *L. exaltatus*, la actividad de la enzima α -D-galactosidasa no mostró incremento significativo. En los regímenes de temperaturas más fríos no hubo diferencias a través del tiempo en la actividad de esta enzima, con una concentración aproximada de 10 000 U/mg de proteína total. En cambio, en la temperatura de germinación más cálida de 30 °C/20 °C, se observó una menor actividad enzimática la cual disminuyó de 4 988.78 a 4 474.26 U/mg de proteína total a medida que transcurrió el tiempo de germinación.

La enzima β -glucosidasa, en *L. exaltatus*, mostró el valor más alto de actividad con 280.25 U/mg de proteína total en la temperatura 30 °C/20 °C a los 15 dds, mientras que, la actividad enzimática más baja (100.54 U/mg de proteína total) fue en ese mismo tiempo, pero en el régimen de temperatura de 25 °C.

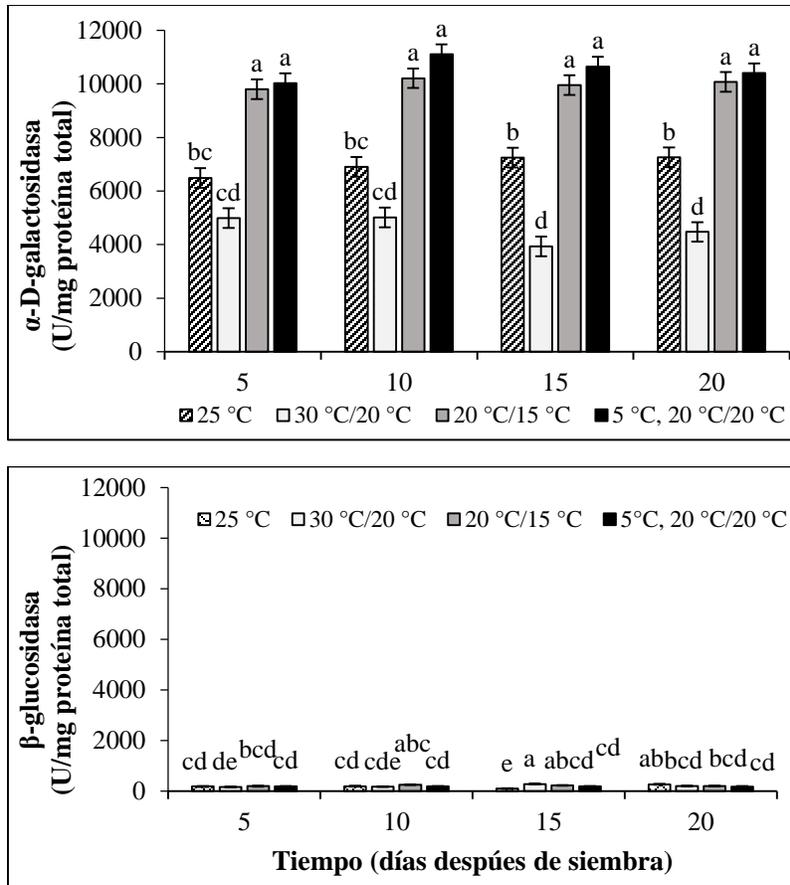


Figura 3.2. Actividad enzimática específica (U/mg de proteína total) de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en semillas de *L. exaltatus* sometidas a cuatro regímenes de temperatura (25 °C constante, 30 °C/20 °C, 20 °C/15 °C y 5 °C 7 días + 20 °C/20 °C) durante el tiempo de germinación (5, 10, 15 y 20 dds). Letras diferentes por temperatura son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

En la especie *C. longirostrata*, la actividad de las dos enzimas fue más alta que en *L. exaltatus*. La enzima α -D-galactosidasa mostró una mayor concentración de actividad a los 15 dds en la temperatura 20 °C/15 °C con 20 357.89 U/mg de proteína total (Figura 3.3).

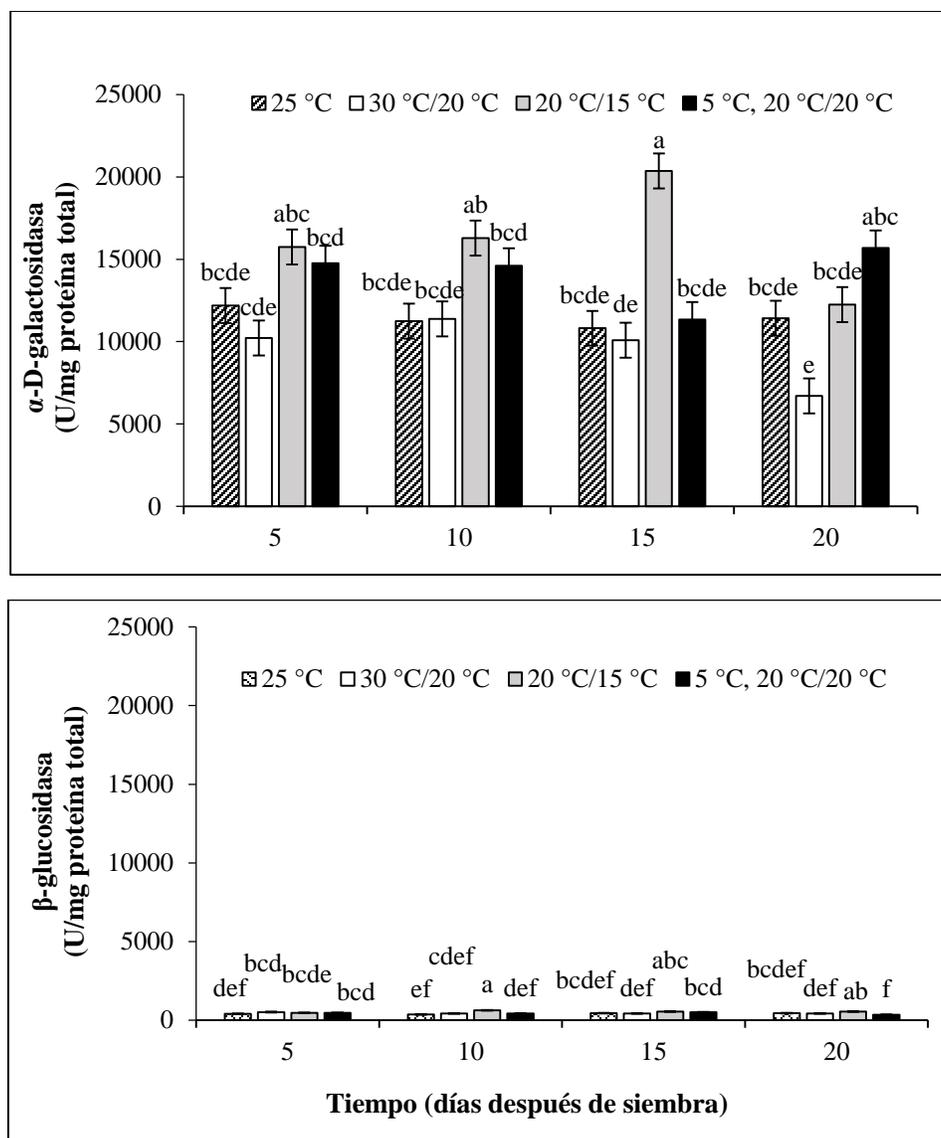


Figura 3.3. Actividad enzimática específica (U/mg de proteína total) de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en semillas de *C. longirostrata* sometidas a cuatro regímenes de temperatura (25 °C constante, 30 °C/20 °C, 20 °C/15 °C y 5 °C 7 días + 20 °C/20 °C) durante el tiempo de germinación (5, 10, 15 y 20 dds). Letras diferentes por temperatura son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

En esta especie la actividad de la enzima fue principalmente de las semillas no germinadas porque cerca del 96.7 % de las semillas permanecieron enteras y duras a los 20 dds; lo cual parece indicar que la actividad de esta enzima no está correlacionada con el porcentaje y velocidad de

germinación. El incremento en actividad enzimática, probablemente se deba a que las semillas estaban en una fase lenta de imbibición y reactivación del metabolismo, donde hubo daño a membranas celulares y salida de solutos, no logrando culminar el proceso de protrusión de la radícula.

La enzima β -glucosidasa mostró la mayor actividad enzimática (630.51 U/mg de proteína total) 10 dds en la temperatura de 20 °C/15 °C (Figura 3.3) y la menor (343.14 U/mg de proteína total) a los 20 dds en el régimen de temperatura 5 °C, 20 °C/20 °C.

3.5. DISCUSIÓN

3.5.1. Efecto de la temperatura sobre el porcentaje y velocidad de germinación

En la familia Fabaceae, la mayoría de especies presentan latencia física asociada a la testa dura que cubre los cotiledones e impide la entrada de agua y oxígeno, y previene o promueve la liberación de inhibidores relacionados al establecimiento o liberación de la latencia (Van Klinken *et al.*, 2006). Esta testa dura puede ser debilitada por fluctuaciones de temperatura en especies adaptadas a climas fríos o templados (Probert, 2000), lo que las haría permeables. Entre las temperaturas estudiadas están la aplicación de calor seco, la exposición a temperaturas extremas naturales o al fuego (Ooi *et al.*, 2014) y se ha observado que las bajas temperaturas producen daño a las membranas celulares durante la imbibición, lo que afecta la germinación de algunas especies (Bewley *et al.*, 2013).

Los regímenes de temperatura aplicados a las semillas de *C. longirostrata* y *L. exaltatus* en su mayoría promovieron germinación, aunque ésta fue muy baja en algunas temperaturas probadas, principalmente para *C. longirostrata* cuyas semillas presentan una testa más dura. Esta especie presentó porcentajes de germinación < 10 %. Lo anterior concuerda con lo observado en estudios del efecto de temperatura en la germinación de leguminosas con latencia física: *Lathyrus* spp., *Lotus corniculatus*, *Medicago* spp., *Trifolium* spp., *Vicia* spp., y *Melilotus albus* (Van Assche *et al.*, 2003), donde semillas expuestas a temperaturas de 10 a 30 °C, en su mayoría presentaron un PG < 10 % en temperaturas de 10 a 23 °C y muy baja a 30 °C. También *Sophora tomentosa* y *Erythrina speciosa*, semillas con latencia física, presentaron alrededor de 13 y 2 % de germinación respectivamente a 30 °C. La testa de ambas especies es similar y consiste de una región extra hilar

con una capa de células en empalizada (cubierta de cutícula, lignina y calosa), una capa de osteoescleridas y tejido esponjoso. En la región hiliar, se encontraron dos capas de células en empalizada, una capa contadora de palizada y debajo una capa de células en empalizada. Por ello, la temperatura no promovió la germinación de manera significativa (Luzia *et al.*, 2015). En contraste, semillas con latencia tegumentaria (tegumento duro e impermeable al agua) como las de *Sesbania virgata* presentaron porcentajes de germinación de 24 % a 25 °C; porcentaje similar al que presentó *L. exaltatus* (24.10 %) a la misma temperatura a los 10 días de germinación. Sin embargo, el índice de velocidad de germinación de *Sesbania virgata* fue menor que el de *L. exaltatus*, con sólo 0.22 semillas día⁻¹ (De Souza *et al.*, 2010). Semillas sin latencia física, como *Diptychandra aurantiaca*, responden a las temperaturas de 25 °C y 30 °C con PG de 97 y 87 % respectivamente. Estas temperaturas de germinación también favorecen la velocidad de germinación con 1.1 semillas día⁻¹ (De Oliveira *et al.*, 2013).

Smýkal *et al.* (2014) indican que la alternancia de temperaturas que libera de la latencia física a una semilla depende de la amplitud de la fluctuación y que la pérdida de latencia en especies de *Medicago*, *Lupinus* y *Trifolium* estuvo determinada por la temperatura diaria máxima, la cual presentó fluctuación de al menos 15 °C con respecto a la temperatura nocturna. Sin embargo, los resultados en *L. exaltatus* indican que la temperatura constante de 25 °C o una fluctuación de 5 °C entre temperatura diurna y nocturna resultó en mayor germinación (> 20 %), indicando la variabilidad específica en esta condición de latencia. Probablemente, la combinación de estas temperaturas con tratamientos pre-germinativos de calor húmedo o seco podrían ayudar a reblandecer la testa para permitir entrada de agua e incrementar germinación (Ramírez y Suárez, 2014; Zuloaga-Aguilar *et al.*, 2011) o combinada con la escarificación con ácidos fuertes como en *L. montanus* (Acosta-Percástegui y Rodríguez-Trejo, 2005), donde se han alcanzado porcentajes de germinación de hasta el 100 % con el régimen de temperatura de 20 °C/15 °C.

3.5.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática específica

Se estudiaron los cambios en actividad de la β -glucosidasa y la α -D-galactosidasa durante 20 días de germinación con la hipótesis de que los regímenes de temperatura aplicados a las especies en estudio pudieran promover la permeabilidad de la testa y con ello, reactivar el metabolismo de las enzimas implicadas en la degradación de polisacáridos.

La liberación de la latencia física conlleva la rehidratación de las semillas, para iniciar la reactivación del metabolismo. En *C. longirostrata* y *L. exaltatus* la actividad de esta enzima se incrementó con regímenes de temperatura de 20 °C/15 °C, y no parece mostrar relación con la germinación (bajos PG obtenidos principalmente en *C. longirostrata*) e incluso la actividad disminuyó con la temperatura de 30 °C/20 °C. Sin embargo, en *L. exaltatus* donde el PG fue de 32 % en la temperatura de 25 °C constante, la testa de estas semillas fue permeable permitiendo la reanudación de actividades metabólicas. Kadlec *et al.* (2008) indican que en el caso de las semillas de soya, chícharo y lupino los niveles de α -galactósidos disminuyen durante los primeros dos días de imbibición, y la hidrólisis de los mismos toma de 4 a 6 días. La enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces entre los polisacáridos que forman la pared celular y las glicoproteínas almacenadas es la α -D-galactosidasa. Esta enzima es responsable de la hidrólisis de los galactanos en las paredes celulares de los cotiledones de *L. angustifolius* (Buckeridge *et al.*, 2005). En *Lycopersicon esculentum*, la enzima β -glucosidasa está implicada en la degradación de los glucomanos de la pared celular del endospermo (Lara-Núñez y Díaz-Pontones, 2011) y en el ablandamiento excesivo durante las etapas de maduración (postcosecha) debido la acción sinérgica de varias enzimas (α -galactosidasa, β -galactosidasa, β -manosidasa y β -glucosidasa) sobre los polisacáridos de la pared celular (Konozy *et al.*, 2012). Probablemente los cambios en las enzimas evaluadas ocurren durante las primeras horas de imbibición por lo que no se pudieron detectar a cinco dds.

La aplicación de tratamientos de escarificación con estas temperaturas y observando los cambios en actividad de estas enzimas durante las primeras horas de imbibición podría indicar con mayor precisión su rol durante este proceso en las especies en estudio.

3.6. CONCLUSIONES

Los regímenes de temperatura cercanos a los presentes en la región de origen de *C. longirostrata* y *L. exaltatus* promovieron la germinación de sus semillas, aún cuando los porcentajes fueron muy bajos en *C. longirostrata*. Las semillas de *C. longirostrata* mostraron una respuesta positiva a germinación en el régimen de temperatura constante de 25 °C y 30 °C/20 °C y *L. exaltatus* en el régimen de temperatura constante de 25 °C y 20 °C/15 °C. Sin embargo, la mayor actividad enzimática de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa se observó en los regímenes de temperatura más

fríos (20 °C/15 °C y 5 °C, 20 °C/20 °C) en ambas especies. La actividad de α -D-galactosidasa superó a la enzima β -glucosidasa en ambas especies.

3.7. LITERATURA CITADA

Acosta-Percástegui, J., and D. A. Rodríguez-Trejo. 2005. Factors affecting germination and pregerminative treatments of *Lupinus montanus* seeds. *Interciencia*. 30: 576-579.

Bewley J. D., K. Bradford, H. Hilhorst, and H. Nonogaki. 2013. *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*. 3rd. ed. Springer Science & Business Media. New York Heidelberg Dordrecht London. 392 p.

Buckeridge, M. S. 2010. Seed cell wall storage polysaccharides: Models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiology*. 154: 1017-1023.

Buckeridge, M. S., H. Pessoa dos Santos, and M. A. S. Tiné. 2000a. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38: 141-156.

Buckeridge, M. S., I. S. Hutcheon, and J. S. G. Reid. 2005. The role of exo-(1 \rightarrow 4)- β -galactanase in the mobilization of polysaccharides from the cotyledon cell walls of *Lupinus angustifolius* following germination. *Annals of Botany*. 96: 435-444.

Buckeridge, M. S., S. M. C. Dietrich, and D. U. de Lima. 2000b. Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. *In: Developments in Crop Science*. 26: 283-315.

Butler, J. T., A. E. Celen, S. L. Webb, D. Krstic, and S. M. Interrante. 2015. Temperature affects the germination of forage legume seeds. *Crop science*. 54: 2846-2853.

Chee, Liew C., M. B. Singh, and P. L. Bhalla. 2014. Unique and conserved features of floral evocation in legumes. *Journal of Integrative Plant Biology*. 56: 714-728.

Cheol, K. S., S. Gon Kim, Dong-Won Bae, H. Young Kim, H. Tae Kim, Y. Hoon Lee, B. Kyu Kang, Seong-Bum Baek, I. Youl Baek, H. Tai Yun, and M. Soo Choi. 2015. Biochemical and proteomic analysis of soybean sprouts at different germination temperatures. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 58: 397-407.

Dehghanpour F. H., R. Tavakkol A., F. Sharifzadeh, and S. Chavoshinasab. 2011. Germination improvement and α -amylase and β -1,3-glucanase activity in dormant and non-dormant seeds of Oregano (*Origanum vulgare*). *Australian Journal of Crop Science*. 5: 421-427.

De Oliveira, A. K. M., J. W. Ferreira R., K. C. Lacerda P., and C. A. Araújo S. 2013. Effects of temperature on the germination of *Diptychandra aurantiaca* (Fabaceae) seeds. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 35: 203-208.

De Souza, V. C., P. F. Montenegro A., L. Alves de A., I. Gomes de O., and L. Soares de O. 2010. Germination of seeds of the invasive plant *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. under effects of light, temperature, and dormancy overcoming. *Semina: Ciências Agrárias*. 31: 889-893.

Fialho, L. D. S., V. Monteze G., C. Marin C., A. Pataro R., D. Silveira B., E. E. de Lima B., M. Alves M., and S. Tavares de R. 2008. Characterization and biotechnological application of an acid α -galactosidase from *Tachigali multijuga* Benth. seeds. *Phytochemistry*. 69: 2579-2585.

Fraile, M. E., M. D. García-Suárez, A. Martínez-Bernal, y R. Slomianski. 2007. Nutritivas y apetecibles: Conozca de leguminosas comestibles. Parte I. Hojas, vainas y semillas. *Contactos*. 66: 27-35.

Gama-Arachchige, N. S., J. M. Baskin, R. L. Geneve, and C. C. Baskin. 2012. The autumn effect: timing of physical dormancy break in seeds of two winter annual species of *Geraniaceae* by a stepwise process. *Annals of Botany*. 110: 637-651.

Gama-Arachchige, N. S., J. M. Baskin, R. L. Geneve, and C. C. Baskin. 2013. Identification and characterization of ten new water gaps in seeds and fruits with physical dormancy and classification of water-gap complexes. *Annals of Botany*. 112: 69-84.

Gerardi, C., F. Blando, A. Santino, and G. Zacheo. 2001. Purification and characterisation of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Science* 160: 795-805.

Gutiérrez-Nava, P., F. De León-González, J. Etchevers-Barra, and A. Casas-Fernández. 2010. Effect of scarification, self-inhibition, and sowing depth on seed germination of *Lupinus campestris*. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 70: 365-371.

ISTA. 2010. International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing. ISBN 3-906549-38-0. Zurich, 21 pp: 288.

Kadlec, P., J. Dostálová, J. Bernášková, and M. Skulinová M. 2008. Degradation of α -galactosides during the germination of grain legume seeds. *Czech Journal of Food Sciences*. 26: 99-108.

Konozy, H. E. E., M. Causse, and M. Faurobert. 2012. Cell wall glycosidase activities and protein content variations during fruit development and ripening in three texture contrasted tomato cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 19: 277-283.

Lara-Núñez A., y D. M. Díaz-Pontones. 2011. Movilización de mananos de reserva en semillas durante la germinación y post-germinación. *REB*. 30: 109-115.

Liyanage, S. G., and M. K. J. Ooi. 2015. Intra-population level variation in thresholds for physical dormancy-breaking temperature. *Annals of Botany*. 116: 123-131.

Lizarazo, I. C., M. Yli-Halla, and F. L. Stoddard. 2015. Pre-crop effects on the nutrient composition and utilization efficiency of faba bean (*Vicia faba* L.) and narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 103: 311-327.

- Luzia, D. C. M., A. Souza de P., M. Santos, and M. T. Silveira P. 2015. Dormancy-breaking requirements of *Sophora tomentosa* and *Erythrina speciosa* (Fabaceae) seeds. *Revista de Biología Tropical*. 63: 285-294.
- Markwell, M. A. K., S. M. Haas, L. L. Bieber, and N. E. Tolbert. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*. 87: 206-210.
- Mauch, F., L. A. Hadwiger, and T. Boller. 1984. Ethylene: Symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiology*. 76: 607-611.
- Minic, Z. 2008. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta*. 227: 723-740.
- Morbeck, de O. A., K. J. W. Ferreira R., K. C. Lacerda P., and C. A. Araújo S. 2013. Effects of temperature on the germination of *Diptychandra aurantiaca* (Fabaceae) seeds. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 35: 203-208.
- Nkang, A. 2002. Carbohydrate composition during seed development and germination in two subtropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*). *Journal of Plant Physiology*. 159: 473-483.
- Ooi, M. K. J., A. J. Denham, V. M. Santana, and T. D. Auld. 2014. Temperature thresholds of physically dormant seeds and plant functional response to fire: variation among species and relative impact of climate change. *Ecology and Evolution*. 4: 656-671.
- Prajapati, D. V., G. K. Jani, N. G. Moradiya, N. P. Randeria, B. J. Nagar, N. N. Naikwadi, and B. C. Variya. 2013. Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*. 60: 83-92.

Probert, R. J. 2000. The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination. *In: Seeds: The ecology of regeneration in plant communities*. 2nd. ed. M. Fenner (ed.). CAB International. UK. pp: 261-292.

Ramírez, V. R., y H. Suárez M. 2014. Evaluation of pregerminative treatments and morphological characterization of “butterfly pea” (*Clitoria ternatea* L.) seedlings cultivated in trays. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*. 1: 249-259.

Ross, S. G., R. J. Redgwell, and E. A. MacRae. 1993. Kiwifruit β -galactosidase: Isolation and activity against specific fruit cell-wall polysaccharides. *Planta*. 189: 499-506.

SAS Institute. 2010. SAS System for Windows, Release 9.3, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.

Scott, S. J., A. R. Jones, and A. W. Williams. 1984. Review of data analysis methods for seed germination. *Crop Science*. 24: 1192-1198.

Smýkal P., V. Vernoud, M. Blair, A. Soukup, and R. Thompson. 2014. The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science*. 5: 1-19.

Sousa, S. M., y A. Delgado S. 1998. Leguminosas mexicanas: Fitogeografía, endemismo y orígenes. *In: Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa. (eds.). Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología, UNAM, México. pp: 449-500.

Suda, N. K. C., M. S. Buckeridge, and J. F. Giorgini. 2003. Cell wall hydrolases in the seeds of *Euphorbia heterophylla* L. during germination and early seedling development. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 15: 135-143.

Van Assche, J. A., K. L. A. Debucquoy, and W. A. F. Rommens. 2003. Seasonal cycles in the germination capacity of buried seeds of some Leguminosae (Fabaceae). *New Phytologist*. 158: 315-323.

Van Klinken, R. D., L. K. Flack, and W. Pettit. 2006. Wet-season dormancy release in seed banks of a tropical leguminous shrub is determined by wet heat. *Annals of Botany*. 98: 875-883.

Zuloaga-Aguilar, S., O. Briones, and A. Orozco-Segovia. 2011. Seed germination of montane forest species in response to ash, smoke and heat shock in Mexico. *Acta Oecologica*. 37: 256-262.

CAPÍTULO IV

EFFECTO DE TRATAMIENTOS PRE-GERMINATIVOS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE β -GLUCOSIDASA Y α -D-GALACTOSIDASA DURANTE LA GERMINACIÓN DE *L. exaltatus* Y *C. longirostrata*

4.1. RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto de tratamientos pre-germinativos (TPG) sobre el porcentaje (PG), velocidad de germinación (VG) y actividad enzimática específica de β -glucosidasa y α -D-galactosidasa, se aplicaron cinco TPG a semillas de *L. exaltatus* y *C. longirostrata*: (1) H_2SO_4 , 98 % 15 min, (2) H_2O 80 °C 1 min, (3) choque de calor seco a 150 °C, (4) choque de calor seco (fuego) 80 °C 7 min, (5) alternancia de temperatura 35 °C/25 °C, y (6) control. Los TPG 1 y 2 se aplicaron a *C. longirostrata* y todos excepto el tratamiento 2 a *L. exaltatus*. La actividad enzimática específica constitutiva de β -1,3-glucanasa, α -amilasa, β -glucosidasa y α -D-galactosidasa fue también determinada en semillas enteras, testa y cotiledones de ambas especies. Para cada TPG, lotes triplicados de semillas desinfectadas fueron puestas a germinar en cámara de crecimiento a 25 °C con fotoperiodo 12 h durante 0, 6, 18, 36, 72 y 120 h. Paralelamente se realizó la curva de absorción de agua para cada TPG. Para la actividad enzimática de β -glucosidasa, α -D-galactosidasa, β -1,3-glucanasa y α -amilasa, los sustratos artificiales fueron p-nitrofenol β -D-glucopiranosido 40 mM, p-nitrofenol α -D-galactopiranosido 20 mM, Laminarina 10 % y almidón 1 %, respectivamente. La máxima absorción de agua de las semillas se presentó con el TPG 1 en *L. exaltatus* y en el 2 en *C. longirostrata*. A las 120 h, el mayor PG fue observado para el TPG 1 en *L. exaltatus* (30.95 %). En *C. longirostrata* fue en TPG 1 (47.89 %) y desde las 72 h con el TPG 2 (48.67 %). El TPG 1 también promovió una mayor VG en ambas especies, siendo de 0.37 semillas h^{-1} a las 36 h en *C. longirostrata* y 0.09 semillas h^{-1} a las 72 h en *L. exaltatus*. En ambas especies, las enzimas presentaron actividad constitutiva en semillas sin TPG, siendo α -D-galactosidasa la que se expresó en mayor concentración en semillas, cotiledón y testa, principalmente en *C. longirostrata*. Mientras que, las de β -1,3-glucanasa y α -amilasa fueron bajas en ambas especies. La actividad de α -D-galactosidasa en ambas especies tuvo relación positiva con el PG. En *C. longirostrata* en el TPG 2 a las 72 h, la actividad fue de 82 624.20 U/mg de proteína total. En contraste, β -glucosidasa presentó una relación inversa con PG. El TPG 3 tuvo

un efecto negativo sobre PG, VG y actividad enzimática específica de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en ambas especies.

Palabras clave: Tratamientos pre-germinativos, absorción de agua, porcentaje de germinación, α -D-galactosidasa, β -glucosidasa.

4.2. INTRODUCCIÓN

Para que una semilla madura reactive su metabolismo e inicie con los eventos celulares que conducen a la protrusión de la radícula, se requiere de la absorción o imbibición de agua. Hay semillas que poseen testas blandas que permiten la rápida absorción de agua, pero también hay semillas con testas duras que funcionan como barrera física para la entrada de agua (Smýkal *et al.*, 2014), entre ellas las de la familia Fabaceae. Las semillas con esta latencia física, presentan una absorción neta de agua mínima en la fase II de la germinación, lo que limita la restauración de la integridad celular, reparación mitocondrial, iniciación de la respiración y reparación del ADN; en contraste con las semillas sin latencia donde ocurren estos eventos y otros adicionales para la aparición de la radícula. Aunque las semillas latentes pueden alcanzar la fase II, sólo las que completan la germinación entran a la fase III, producida por la expansión celular asociada con la protrusión de la radícula (Herrera *et al.*, 2006; Bewley *et al.*, 2013).

Desde el punto de vista agrícola, las semillas con latencia física son una limitante para el establecimiento de un cultivo, ya que causan la reducción de la germinación y heterogeneidad en la emergencia de la plántula. Por lo que, diferentes métodos de escarificación se han probado para romper la latencia física impuesta por la testa impermeable y lograr la germinación; entre los más populares se encuentra la escarificación ácida, mecánica, congelación y descongelación y calor seco (Kimura y Islam, 2012; Silveira y Overbeck, 2013; Tiryaki y Topu, 2014; De Morais *et al.*, 2014). Pero también el calor húmedo ha sido utilizado para romper la latencia física, como en la fabácea *Peltophorum pterocarpum* (Atencio *et al.*, 2003). La respuesta a estos tratamientos pre-germinativos depende de la especie y del ambiente donde se desarrolla. Las semillas de *Lupinus lepidus* incrementan significativamente el porcentaje de germinación cuando se les aplica un choque térmico; las de *L. polyphyllus* responden a alternancias de temperatura que simulaban invierno frío y, las de *L. albicaulis* a tratamientos de altas temperaturas (Elliott *et al.*, 2011).

Durante la imbibición de las semillas, diversas enzimas son activadas. En *Gliricidia sepium*, la actividad de α -amilasa aumenta durante la imbibición mostrando un pico máximo en el séptimo día de imbibición, ésta actividad se correlaciona con el porcentaje de germinación de semillas frescas (Ribeiro *et al.*, 2011). En cultivares de *Phaseolus vulgaris* L., la actividad de α -amilasa, durante la imbibición presentó diferencias entre cultivares. Los cotiledones del cultivar negro presentaron la máxima actividad a las 24 h de imbibición mientras que los del cultivar blanco a las

48 h (Romano *et al.*, 2014). Actividades de α -galactosidasas durante la imbibición se han observado en semillas de chícharo, donde la actividad máxima de una α -galactosidasa alcalina (pH 7.5) se detectó a las 64 h de imbibición, en contraste, a lo observado para una α -galactosidasa ácida que no mostró cambios durante la imbibición y germinación (Blöchl *et al.*, 2008). Sin embargo, en semillas de *Tachigali multijuga* Benth., se hallaron niveles altos de actividad de una α -galactosidasa ácida a las 108 h después de imbibición (Fialho *et al.*, 2008). Otras enzimas que tienen un rol importante en la regulación de la germinación y latencia es la β -1,3-glucanasa (Leubner-Metzger, 2003), catalasa (Aniszewski, 2010) y la β -glucosidasa (Gallardo *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha demostrado que la testa controla la producción de enzimas hidrolasas, α -galactosidasa y endo- β -mananasa, en el endospermo de semillas en desarrollo (Piotrowicz-Cieślak *et al.*, 2008). En *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., se halló actividad de endo- β -mananasa y α -galactosidasa en la testa y α -galactosidasa en el endospermo durante la degradación del polisacárido galactomanano que ocurre después de la germinación (Tonini *et al.*, 2007). La testa tiene células metabólicamente activas, con actividad de endo- β -mananasa y α -galactosidasa, pero probablemente una alta concentración de ácido abscísico en semillas maduras regule negativamente la movilización de polisacáridos de almacenamiento (galactomanano) antes que el embrión requiera los azúcares para su crecimiento (Buckeridge, 2010).

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar la actividad de las enzimas β -1,3-glucanasa, β -glucosidasa, α -D-galactosidasa y α -amilasa en los componentes de las semillas de *C. longirostrata* y *L. exaltatus* y el efecto de tratamientos pre-germinativos (físico-químicos) en el porcentaje y velocidad de germinación, y la actividad enzimática de β -glucosidasa y α -D-galactosidasa.

4.3.MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Procedencia de semillas

Semillas de *L. exaltatus* fueron obtenidas de la Región de los Valles de Serdán y Libres en el estado de Puebla y de *C. longirostrata* de Macuspana, Tabasco y se conservaron a 4 °C, en recipientes de plástico en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del *Campus*, Tabasco, México.

4.3.2. Tratamientos pre-germinativos aplicados

Los pre-tratamientos aplicados a las semillas a las 0, 6, 18, 36, 72 y 120 h después de la siembra para debilitar la testa e inducir germinación fueron: **1)** Inmersión de semillas en H₂SO₄ al 98 % durante 15 min seguido de tres lavados con agua destilada estéril, **2)** Inmersión de semillas en agua destilada a 80 °C durante 1 min (calor húmedo), **3)** Inmersión de semillas en arena húmeda por 8 h a 35 °C, seguidas de 16 h a 25 °C (calor húmedo) en cámara de crecimiento marca Lumistell modelo ICP-19, **4)** Secado de semillas a 80 °C por 7 min, posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente (23-25 °C) (calor seco), **5)** Secado de semillas en arena seca a 150 °C durante 1 min (calor seco alta temperatura), **6)** Sin ningún tratamiento (testigo).

De estos tratamientos, a *C. longirostrata* se aplicaron 1, 2 y 6, y a *L. exaltatus* 1, 3, 4, 5 y 6. El tamaño de los lotes fueron de 35 y 20 semillas para *L. exaltatus* y lotes de 50 y 30 semillas para *C. longirostrata*. Las semillas se sembraron en cajas Petri desinfectadas entre papel estéril en una cámara bioclimática marca Thermo scientific a 25 °C con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad (Acosta-Percástegui y Rodríguez-Trejo, 2005; Gutiérrez-Nava *et al.*, 2010) durante 120 h. Todos los lotes de semillas fueron regados con agua destilada estéril durante el periodo de evaluación.

4.3.3. Desinfección de semillas

La desinfección se realizó con hipoclorito de sodio al 3 % durante 2 min, excepto para los lotes correspondientes al tratamiento de escarificación que se hizo con H₂SO₄ al 98 %.

4.3.4. Prueba de absorción de agua

La prueba se llevó a cabo con lotes por triplicado de cinco semillas de cada pre-tratamiento por especie. Se sembraron en cajas Petri de plástico entre papel absorbente estéril en una cámara de crecimiento marca Thermo scientific modelo 818, a 25 °C con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h

oscuridad durante 120 h. Al término de 0, 6, 18, 36, 72 y 120 horas después de siembra (hds), las semillas de cada lote por repetición fueron pesadas.

4.3.5. Determinación del porcentaje y velocidad de germinación

El porcentaje de germinación (PG) corresponde a la relación entre el número de semillas germinadas y el número de semillas sembradas y se determinó con la fórmula (Scott *et al.*, 1984):

$$PG (\%) = \frac{NTSG}{NTSS} \times 100$$

donde NTSG = Número total de semillas germinadas,

NTSS = Número total de semillas sembradas.

Para la prueba de germinación, se realizó un conteo diario considerando germinada una semilla cuando la radícula tenía una longitud ≥ 2 mm.

La velocidad de germinación (VG) es definida como la medida del número de semillas germinadas en relación con el tiempo de germinación y se determinó con la fórmula:

$$VG = \frac{\sum(n_i)}{t}$$

donde n_i = Número de semillas germinadas en día i ;

t = Tiempo de germinación desde la siembra hasta la germinación de la última semilla.

4.3.6. Determinación de la actividad enzimática de β -glucosidasa, α -D-galactosidasa, β -1,3-glucanasa y α -amilasa

4.3.6.1. Obtención del extracto crudo enzimático a partir de polvos secos de acetona

El extracto crudo enzimático a partir de los polvos de acetona (PDA) fue preparado de acuerdo a Gerardi *et al.*, 2001 con algunas modificaciones, como se menciona a continuación. Muestras por triplicado de cada tratamiento, con peso promedio de 0.484 ± 0.01 g y 0.475 ± 0.03 g en *C. longirostrata* y *L. exaltatus* respectivamente, se colocaron en morteros enfriados y se les adicionó N_2 líquido para su molido homogéneo. Posteriormente, se desengrasaron con hexano al 95 % relación 1:10 (p/v), en agitación constante a 150 rpm por dos h a 4 °C, y se centrifugaron a 10 000 rpm por cinco min a 4 °C. El sobrenadante se decantó y el precipitado se dejó una h en reposo

hasta la evaporación completa del solvente. Enseguida, se realizaron tres extracciones sucesivas con acetona al 80 % relación 1:3 (p/v), homogenizando la muestra y centrifugando entre cada una a 5 000 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante fue desechado. Para terminar, se realizó una extracción con acetona al 100 % relación 1:3 (p/v) a 10 000 rpm por 5 min a 4 °C, desechando el sobrenadante, y el residuo se dejó a temperatura ambiente hasta la evaporación completa del solvente. La pasta resultante fue molida hasta su pulverizado homogéneo y conservado a -67 °C. El extracto crudo enzimático fue obtenido a partir de 15 mg de PDA a los que se les adicionaron 30 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) (Sigma) y 900 µL de Triton X100 (Sigma) al 1 % en una solución de 100 mM pH 7.0 de regulador Tris ultrapure (Invitrogen). Todo se incubó a 37 °C en baño maría por 30 min en agitación constante a 150 rpm; posteriormente fueron centrifugados a 10 000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para la determinación enzimática de β -1,3-glucanasa y β -glucosidasa en ambas especies; α -amilasa sólo en *L. exaltatus*.

4.3.6.2. Obtención del extracto crudo enzimático con regulador de acetato de sodio

El extracto crudo enzimático con regulador de acetato de sodio fue preparado de acuerdo a Fialho *et al.*, 2008 con algunas modificaciones, como se mencionan a continuación. Muestras por triplicado de cada tratamiento, con peso promedio de 0.301 ± 0.01 g y 0.271 ± 0.01 g en *C. longirostrata* y *L. exaltatus* respectivamente, se colocaron en morteros fríos y se les adicionó N₂ líquido para su molido homogéneo, posteriormente, se adicionaron 20 mL de regulador de acetato de sodio trihidratado grado ACS (Fermont) 15 mM a pH 5.5 y se homogenizaron. El homogenizado fue centrifugado a 4 °C a 10 000 rpm durante cinco min. El sobrenadante fue decantado y almacenado a -67 °C para la determinación posterior de la actividad enzimática de α -D-galactosidasa en ambas especies; α -amilasa sólo en *C. longirostrata*.

4.3.7. Actividad enzimática de β -glucosidasa

La actividad de β -glucosidasa se determinó según Ross *et al.* (1993) y Gerardi *et al.* (2001). 200 µL del extracto enzimático, se mezclaron con 200 µL de regulador acetato de sodio 125 mM pH 4.0, que contenía 2- β -mercaptoetanol 200 mM, 50 µL de sustrato p-nitrofenol β -D-glucopiranosido 40 mM (Sigma, código 101331364) y agua desionizada estéril en un volumen final de 1000 µL. Todo se mezcló en vortex y se incubó a 30 °C durante 60 min. La reacción se detuvo con la adición de 200 µL de carbonato de sodio anhidro (Na₂CO₃) 1 M. En las muestras testigos, la reacción

enzimática se detuvo antes de la incubación. La absorbancia se midió a 405 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific modelo Multiskan Go. Los resultados se expresaron en actividad enzimática específica, misma que se representa como las Unidades de enzima liberadas por mg de proteína total. La curva patrón se elaboró usando p-nitrofenol (Sigma, código 1001837652) como estándar a una concentración de 0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, y 10000 μM . Una unidad de β -glucosidasa fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar un μM de p-nitrofenol por minuto bajo las condiciones de ensayo descritas.

4.3.8. Actividad enzimática de α -D-galactosidasa

La actividad se realizó de acuerdo a Fialho *et al.* (2008). Se determinó usando 100 μL de extracto enzimático, 600 μL regulador de acetato de sodio 200 mM pH 5.0 y 50 μL de sustrato p-nitrofenol α -D-galactopiranosido 20 mM (Sigma, código 101457839) en un volumen final de 1000 μL . La reacción se llevó a cabo durante 15 min a 40 °C y se detuvo con la adición de 250 μL de Na_2CO_3 2 M. Posteriormente, se centrifugó a 10 000 rpm durante cinco min a temperatura ambiente. Para los testigos, la reacción enzimática se detuvo antes de la incubación. Finalmente, se realizó una curva patrón de p-nitrofenol (Sigma, código 1001837652) a una concentración de 0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 y 10000 μM para interpolar los datos. La cantidad de p-nitrofenol liberado se midió a una absorbancia de 410 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific modelo Multiskan Go. Los resultados se expresaron en actividad enzimática específica, misma que se representa como las Unidades de enzima liberadas por mg de proteína total. Una unidad de actividad enzimática de α -D-galactosidasa fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar un μM de p-nitrofenol por minuto bajo las condiciones de ensayo descritas.

4.3.9. Actividad enzimática de β -1,3-glucanasa

La reacción enzimática fue determinada con Laminarina (Sigma, código 1001619715) como sustrato. A 200 μL de extracto enzimático, se le agregó Laminarina al 10 % (p/v) disuelto en regulador de acetato de sodio 100 mM pH 5.0 (Mauch *et al.*, 1984), 100 μL de regulador acetato de sodio 1 M pH 5.0; y se llevó a un volumen final de 1000 μL con agua desionizada estéril. La reacción se incubó durante 30 min a 50 °C y se detuvo con la adición de 300 μL de ácido 3, 5 dinitrosalicílico (DNS) (Bello *et al.*, 2006) y 10 min de ebullición. Para las muestras testigos se siguió el mismo procedimiento sólo que la reacción enzimática se detuvo antes de la incubación.

La curva patrón se elaboró usando glucosa, de la cual se prepararon las concentraciones de 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de glucosa. La absorbancia de la curva y de la mezcla de reacción de muestras y testigos se determinó a 540 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific modelo Multiskan Go. Los resultados se expresaron en actividad enzimática específica, misma que se representa como las Unidades de enzima liberadas por mg de proteína total. Una unidad de actividad enzimática de β -1,3-glucanasa fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar un μM de glucosa por minuto bajo las condiciones de ensayo descritas.

4.3.10. Actividad enzimática de α -amilasa

La actividad se determinó por el método de Baker (1991) y Bernfeld (1991) modificado por Dehghanpour *et al.* (2011). A 200 μL de extracto enzimático, se le adicionaron 300 μL de una solución al 1 % de almidón (Sigma) en regulador de fosfato de potasio 100 mM pH 7.2 (fosfato de potasio dibásico K_2HPO_4 100 mM + fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 100 mM) (Sambrook y Russell, 2001) y se llevó a un volumen final de 1000 μL con agua desionizada estéril. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 30 min. Al término, se colocó en baño maría durante 10 min en ebullición para detener la reacción enzimática. Las muestras testigos fueron puestas a ebullición antes de ser incubadas. Todas las muestras, se dejaron enfriar y a partir del hidrolizado se determinaron los azúcares reductores generados con el kit GAGO 20 (Sigma, código 1002023091), siguiendo las recomendaciones del fabricante y usando glucosa para la curva patrón. La absorbancia se leyó inmediatamente a 540 nm. Los resultados se expresaron en actividad enzimática específica, misma que se representa como las Unidades de enzima liberadas por mg de proteína total. Una unidad de actividad enzimática de α -amilasa fue definida como la cantidad de enzima capaz de liberar un μM de glucosa por minuto bajo las condiciones de ensayo descritas.

4.3.11. Proteína total

La concentración de proteína total se determinó por el método de Micro Markwell (Markwell *et al.*, 1978) adicionando en tubos de vidrio, 300 μL de muestra (20 μL del extracto enzimático y 280 μL de agua desionizada estéril). En el extracto PDA, los 20 μL se tomaron a partir de una dilución 1:4. En agitación, se agregaron 1000 μL de una solución compuesta por: **A** [solución al 2 % de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3) J. T. Baker, 0.4 % de hidróxido de sodio ACS (NaOH) Fermont, 0.16 % de tartrato de sodio y potasio ACS ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) Fermont, 1 % de sulfato dodecil de sodio ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$), J.T. Baker], más solución **B** [solución 1:100 p/v de sulfato

cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ACS, Fermont]. La mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Al terminar, en agitación, se agregaron 100 μL Folin & Ciocalteu's (Merck, código HC097873): agua en proporción 1:1. Posteriormente, se incubó durante 45 min a 37 °C. Los péptidos liberados durante la reacción se midieron a 660 nm, usando albúmina sérica bovina (Sigma código A2153) para la curva patrón a una concentración de 0 a 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.3.12. Azúcares reductores

Para cuantificar los azúcares reductores generados del hidrolizado de la enzima α -amilasa se utilizó el kit Gago 20 (Sigma, código 1002023091) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se tomaron 250 μL del hidrolizado, 500 μL de la solución de ensayo (o-dianisidina y glucosa oxidasa/peroxidasa) y se incubaron a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo al añadir 500 μL de ácido sulfúrico 12 N, se mezcló en un vortex. Finalmente se realizó una curva patrón usando glucosa a una concentración de 0, 20, 40 y 60 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La absorbancia se leyó a 540 nm.

4.3.13. Análisis estadístico

Los datos de PG fueron transformados a la raíz cuadrada del arcoseno para tener una distribución normal aproximada de los porcentajes de germinación y junto con los datos de VG, imbibición y actividad enzimática específica de las enzimas evaluadas fueron sometidas a análisis de varianza por especie, bajo un diseño completamente al azar en arreglo factorial. En *L. exaltatus*, el primer factor fueron los tratamientos pre-germinativos con 5 niveles (H_2SO_4 98 %, arena seca 80 °C, arena seca 150 °C, arena húmeda 35 °C/25 °C y el testigo), el segundo factor fue el tiempo de germinación con 6 niveles (0, 6, 18, 36, 72 y 120 h) y sus interacciones. En *C. longirostrata*, el primer factor fueron los tratamientos pre-germinativos con 3 niveles (H_2SO_4 98 %, H_2O 80 °C y el testigo), el segundo factor fue el tiempo de germinación con 6 niveles (0, 6, 18, 36, 72 y 120 h) y sus interacciones. Pruebas de medias de Tukey fueron aplicadas para distinguir diferencias entre los tratamientos utilizando el programa estadístico SAS 9.3.

Los datos de actividad enzimática específica de α -amilasa, β -glucosidasa, β -1,3-glucanasa y α -D-galactosidasa en las semillas y sus componentes (testa, cotiledones), fueron sometidos a un análisis de varianza y pruebas de medias Tukey por especie. El diseño usado fue un completamente al azar con tres repeticiones, el análisis se realizó con el programa estadístico SAS.

4.4. RESULTADOS

Las semillas de las dos especies de leguminosas estudiadas presentan diferente grado de latencia física al observarse variación en los porcentajes de germinación que hubo en los regímenes de temperatura ya estudiados en el Capítulo III. Esta latencia física dada por la impermeabilidad de la testa de ambas especies fue un aspecto determinante en el bajo PG. Para reblandecer la testa y promover la germinación se optó por aplicar tratamientos de escarificación física o química, con un régimen de temperatura constante de 25 °C, régimen donde se observó una mejor respuesta a la germinación en ambas especies.

4.4.1. Absorción de agua después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos para reblandecer la testa de las semillas

Los tratamientos pre-germinativos mostraron efecto significativo sobre la absorción de agua de *C. longirostrata* ($p \leq 0.001$) y *L. exaltatus* ($p \leq 0.0001$). El tiempo de exposición tuvo un efecto significativo ($p \leq 0.0001$) sobre la absorción de agua de las semillas de ambas especies (Cuadro 4.1). Asimismo, el efecto de la interacción tratamiento pre-germinativo por tiempo fue significativo ($p \leq 0.0001$) en las semillas de *L. exaltatus*; ésta también fue significativa ($p \leq 0.05$) para las de *C. longirostrata*. La Figura 4.1 muestra las interacciones de los tratamientos pre-germinativos por tiempo.

Cuadro 4.1. Análisis de varianza para la absorción de agua (g) de semillas de *L. exaltatus* y *C. longirostrata* después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos.

Fuente de variación	Grados de libertad (gL)	Cuadrado medio
<i>L. exaltatus</i>		
Tratamiento pre-germinativo (TP)	4	0.01***
Tiempo (T)	5	0.0038***
TP*T	20	0.00065**
Error	60	0.00026
<i>C. longirostrata</i>		
Tratamiento pre-germinativo (TP)	2	0.01**
Tiempo (T)	5	0.01***
TP*T	10	0.0018*
Error	36	0.00057

* ($p \leq 0.05$); ** ($p \leq 0.01$); *** ($p \leq 0.0001$).

En *L. exaltatus*, el tratamiento donde se observó el mayor incremento en peso de semillas fue en el de ácido sulfúrico al 98 % por 15 min, lo que significa que la absorción de agua fue más rápida que en los otros tratamientos (Figura 4.1a). A partir de la 36 h inició la germinación en este tratamiento y en el de arena húmeda a 35 °C, por lo que a partir de este tiempo la ganancia de peso fue estuvo asociada con la germinación de las semillas. Los tratamientos donde se aplicó calor seco (arena seca 80 °C y a 150 °C) y alternancia de temperatura (arena húmeda 35 °C/25 °C) no superaron al control, especialmente el calor seco a 150 °C, donde no se observó incremento de peso, indicando un efecto contrario al reblandecimiento de la testa.

En la especie *C. longirostrata*, se aplicaron dos tratamientos pre-germinativos para escarificar las semillas. A partir de 72 h se incrementó el peso de las semillas escarificadas, indicando absorción de agua tal vez por la permeabilidad de la testa, siendo el tratamiento de agua a 80 °C por 1 min donde se observó la mayor absorción de agua seguido del tratamiento de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 98 %) por 15 min, comparado con el control (Figura 4.1b). A este tiempo, el incremento en peso de las semillas fue afectado por el crecimiento del embrión y emergencia de la radícula, ya que más del 50 % de semillas iniciaron germinación. Esto indica que estos tratamientos lograron reblandecer la testa, por lo que se espera un alto porcentaje de germinación después de su aplicación.

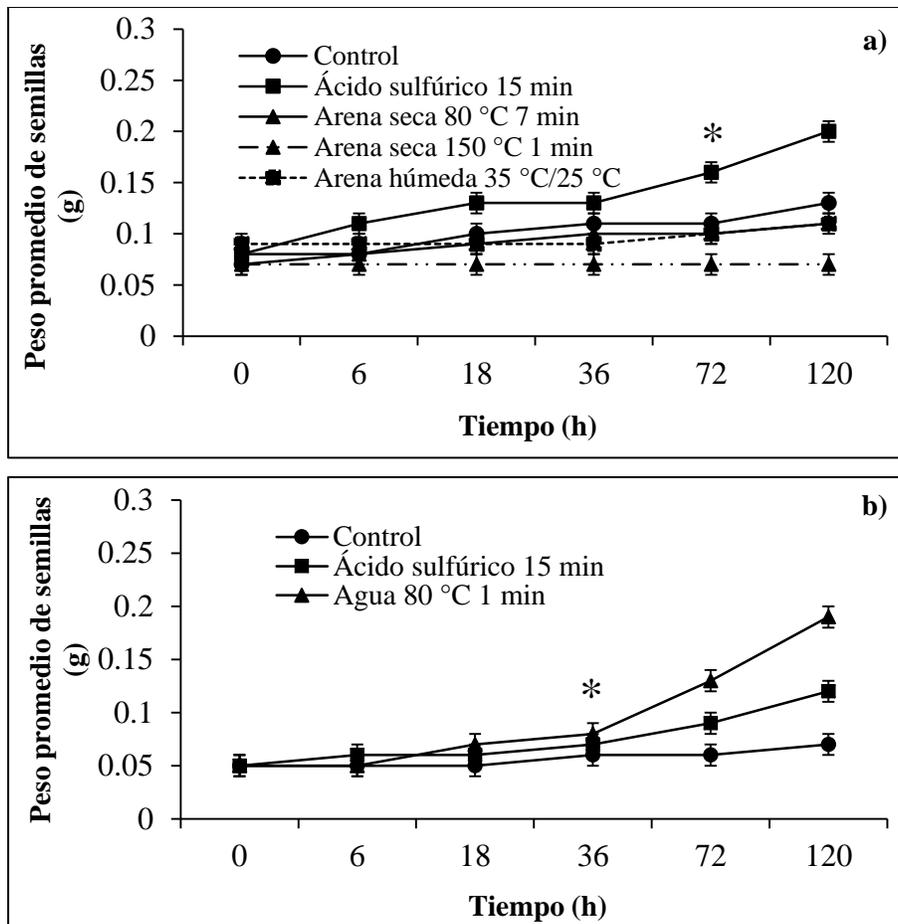


Figura 4.1. Peso acumulado de semillas (absorción de agua) de *L. exaltatus* (a) y *C. longirostrata* (b) después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos a través del tiempo.
*: Inicio de la germinación.

4.4.2. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje y velocidad de germinación

Los tratamientos pre-germinativos para reblandecer la testa que se utilizaron para la prueba de absorción de agua también se utilizaron para la prueba de germinación. El análisis de varianza para PG y VG (Cuadro 4.2) indica que los tratamientos, el tiempo de germinación y la interacción tuvieron un efecto significativo ($p \leq 0.0001$) en ambas especies. Es decir, el reblandecimiento de la testa para la absorción de agua y liberación de la latencia física dependió del tratamiento aplicado y del tiempo de absorción de agua.

Cuadro 4.2. Análisis de varianza para el porcentaje y velocidad de germinación de semillas de *L. exaltatus* y *C. longirostrata* después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos.

Fuente de variación	Grados de libertad (gL)	Cuadrado medio	
		Porcentaje de germinación	Velocidad de germinación
<i>L. exaltatus</i>			
Tratamiento pre-germinativo (TP)	4	0.260 ***	0.0071 ***
Horas a germinación (HG)	4	0.349 ***	0.0037 ***
TP*HG	16	0.062 ***	0.0022 ***
Error	125	0.009	0.0005
<i>C. longirostrata</i>			
Tratamiento pre-germinativo (TP)	2	1.283 ***	0.258 ***
Horas a germinación (HG)	4	1.293 ***	0.126 ***
TP*HG	8	0.16 ***	0.037 ***
Error	75	0.009	0.006

*** ($p \leq 0.0001$).

En la Figura 4.2a se muestra el porcentaje de germinación de las semillas de *L. exaltatus* y *C. longirostrata* bajo los diferentes tratamientos pre-germinativos. En *L. exaltatus*, el choque térmico seco (80 °C y 150 °C) inhibieron el proceso de germinación casi en su totalidad. Estos tratamientos probablemente ocasionaron el endurecimiento de la testa y la muerte del embrión. El tratamiento de alternancia de temperatura 35 °C/25 °C no superó al control en porcentaje de germinación, aunque algunas semillas empezaron a germinar 18 h después de siembra.

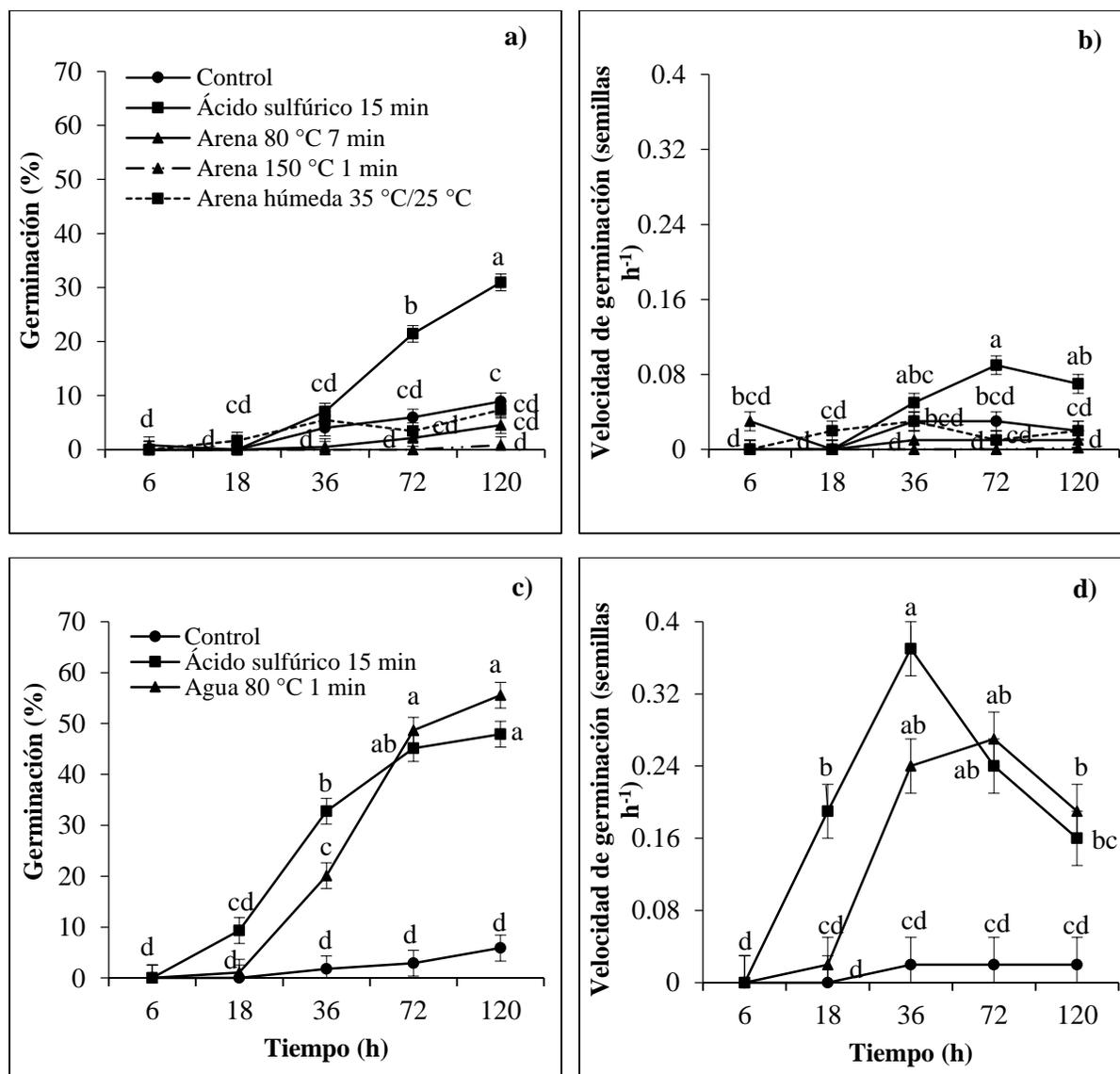


Figura 4.2. Porcentaje y velocidad de germinación de semillas de *L. exaltatus* (a, b) y *C. longirostrata* (c, d) después de la aplicación de tratamiento pre-germinativos. Letras diferentes por tratamiento son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

En contraste, las semillas de *L. exaltatus* presentaron mayor absorción de agua y también mayor porcentaje de germinación al ser escarificadas con ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 98 %) 15 min, comparado con los tratamientos restantes. Al término de las 120 horas, las semillas habían ya alcanzado el 30.95 % de germinación. Este porcentaje fue 11.78 % mayor que el obtenido con el experimento de regímenes de temperatura a los cinco días de germinación (19.17 %). En esta especie no todos los tratamientos aceleraron el proceso de germinación. La VG de las semillas

(Figura 4.2b) fue mayor a las 72 h con el tratamiento de ácido sulfúrico. En contraste, ésta velocidad en los tratamientos restantes fue igual o inferior a la del control. La rapidez de la germinación de las semillas tratadas con ácido sulfúrico estuvo en función del reblandecimiento y daño a la testa. Dado que, con éste tratamiento se presentó mayor absorción de agua en *L. exaltatus* y en *C. longirostrata*, aunque en ésta última especie fue superado por el tratamiento de agua 80 °C.

En contraste a *L. exaltatus*, la respuesta a germinación de las semillas de *C. longirostrata* a los tratamientos pre-germinativos fue mayor (Figura 4.2c). En ésta especie no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.0001$) entre los tratamientos con ácido sulfúrico al 98 % y agua a 80 °C sobre el porcentaje de germinación. A las 120 h, el 47.89 y 55.56 % de las semillas habían ya germinado en los tratamientos de H₂SO₄, 98 % y agua a 80 °C, respectivamente (Figura 4.2c). Estos porcentajes superaron el 4 % de germinación obtenido en el experimento de régimen de temperatura constante de 25 °C del experimento anterior. Esto indica que las semillas de *C. longirostrata* presentan latencia física ocasionada por la dureza e impermeabilidad de la testa y que para liberarla se requieren de tratamientos como los utilizados en este estudio. La mayor velocidad de germinación se observó con el tratamiento de ácido sulfúrico (0.37 semillas h⁻¹) seguido del tratamiento de inmersión en agua a 80 °C durante 1 min con 0.27 semillas h⁻¹ a las 72 h después de siembra (Figura 4.2d).

4.4.3. Actividad enzimática específica en la semilla entera y sus componentes

La actividad de las enzimas α -D-galactosidasa, β -glucosidasa, β -1,3-glucanasa y α -amilasa en la semilla y sus componentes de *L. exaltatus* y *C. longirostrata* se muestra en la Figura 4.3. En ambas especies, la enzima que mostró mayor actividad en todos los componentes de las semillas fue la α -D-galactosidasa, siendo mayor en los cotiledones (4.3a y c). La actividad específica de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en semillas enteras sin ningún tratamiento, mostró mayor actividad en *C. longirostrata* ($11\,375.5 \pm 283.4$ y 261.5 ± 7.6 U/mg de proteína total, respectivamente) que en *L. exaltatus* ($6\,409.3 \pm 283.4$ y 116.0 ± 7.6 U/mg de proteína total, respectivamente). De las enzimas determinadas, α -D-galactosidasa fue la que presentó mayor actividad en ambas especies. En cambio, la actividad de β -glucosidasa fue menor y no se observaron diferencias significativas entre los cotiledones y la semilla entera (Figura 4.3b). La actividad de las enzimas α -amilasa y β -1,3-glucanasa (Figura 4.3b y d) fueron extremadamente bajas en *L. exaltatus* (< 0.01 U/mg de

proteína total) y *C. longirostrata* (< 0.1 U/mg de proteína total). Sin embargo, la actividad de β -1,3-glucanasa depende del componente estudiado, ya que en semillas de *L. exaltatus* la mayor actividad se detectó en el cotiledón (0.003 U/mg de proteína total), y en *C. longirostrata* en la testa (0.08 U/mg de proteína total). La actividad de α -amilasa fue mayor en la testa, en ambas especies. Esto demuestra que los cotiledones y la testa contienen células metabólicamente activas con actividades de estas enzimas, aunque la semilla se encuentre en estado de reposo.

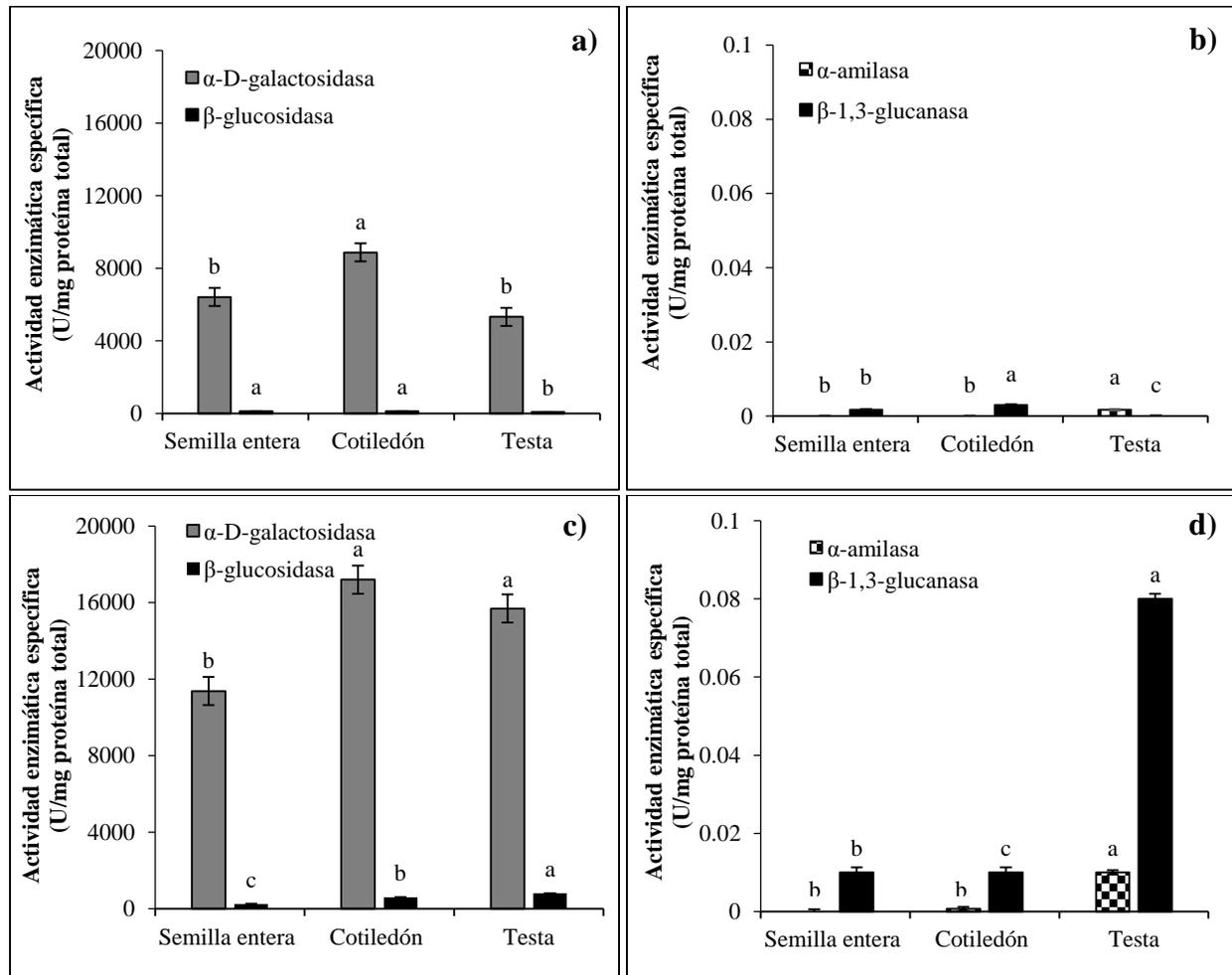


Figura 4.3. Actividad enzimática específica de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en los componentes de las semillas de *L. exaltatus* (a, b) y *C. longirostrata* (c, d). Letras diferentes por enzima son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

La concentración en que se hallaron las cuatro enzimas parece estar asociada al sustrato que degrada. En semillas de leguminosas, los polisacáridos de reserva que se encuentran en mayor

concentración son los galactomananos, sustrato de la enzima α -D-galactosidasa. Por ello, suponemos es la enzima que se expresó en mayor cantidad en ambas especies.

4.4.4. Efecto de diferentes tratamientos para reblandecer la testa sobre la actividad enzimática específica de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa

Los tratamientos pre-germinativos tuvieron un efecto significativo ($p \leq 0.0001$) sobre la actividad enzimática de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa de las semillas germinadas de ambas especies (Cuadro 4.3), así como la interacción tratamiento pre-germinativo por tiempo.

Cuadro 4.3. Análisis de varianza para la actividad de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en semillas de *L. exaltatus* y *C. longirostrata* después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos.

Fuente de variación	Grados de libertad (gL)	Cuadrado medio	
		α -D-galactosidasa	β -glucosidasa
<i>L. exaltatus</i>			
Tratamiento (T)	4	154 544 094 ***	39 297 ***
Horas a germinación (HG)	5	2 201 559 **	3 159 ***
T*HG	20	1 658 664 ***	1 302 **
Error	60	381 605	500
<i>C. longirostrata</i>			
Tratamiento (T)	2	1 560 983 053 ***	20 381 ***
Horas a germinación (HG)	5	1 676 269 271 ***	11 313 ***
T*HG	10	595 678 544 ***	9 289 ***
Error	36	23 093 809	445

** ($p \leq 0.01$); *** ($p \leq 0.0001$).

El tratamiento de choque térmico (arena 150 °C) inhibió por completo la germinación y la actividad enzimática de las enzimas (Figura 4.4), lo que indica que el tratamiento provocó la muerte del embrión. En cuanto a los tratamientos de choque de calor a 80 °C y alternancia de temperatura 35 °C/25 °C, que no tuvieron efecto significativo sobre la liberación de latencia, al no activar el proceso de germinación, tampoco mostraron cambios en la actividad enzimática durante el tiempo de germinación. Aunque la actividad detectada en estas semillas sometidas a estos tratamientos, fue mayor que las del tratamiento control.

En *L. exaltatus*, la actividad enzimática de α -D-galactosidasa se incrementó a medida que se incrementó el porcentaje de germinación de las semillas en el tratamiento de ácido sulfúrico por 15 min hasta las 36 h, para después disminuir (Figura 4.4 a). El pico de la actividad de esta enzima se encontró a las 36 h de absorción de agua con 9 521.3 U/mg de proteína total. Lo que sugiere que la movilización de reservas ocurrió a la hora 36 para incrementar el proceso de germinación por el aporte de energía originado de la degradación de los polisacáridos de reserva, en este caso el galactomanano.

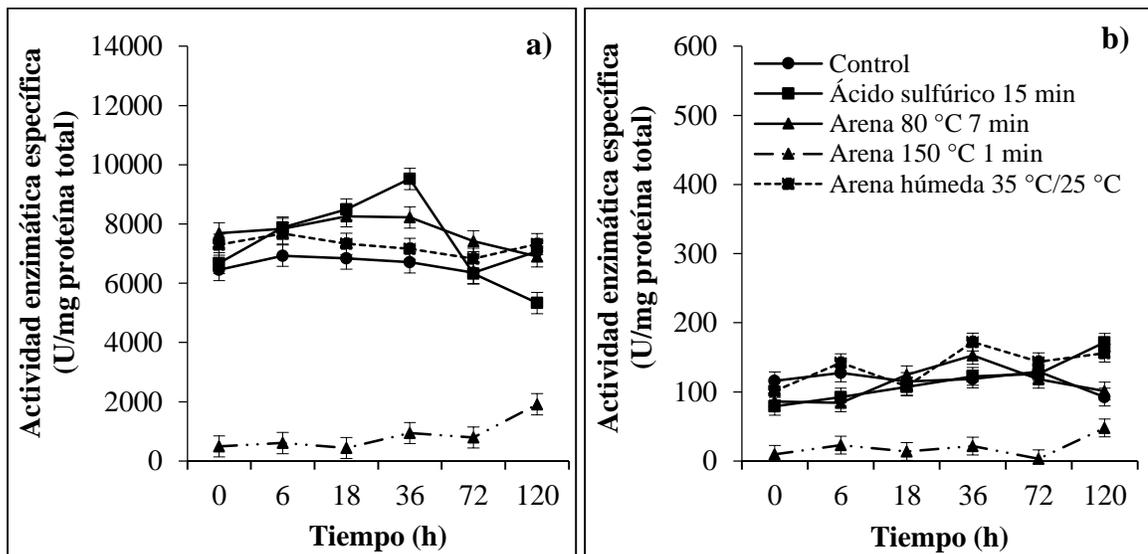


Figura 4.4. Actividad enzimática específica de α -D-galactosidasa (a), β -glucosidasa (b) en semillas de *L. exaltatus* bajo tratamientos pre-germinativos.

En la actividad enzimática de β -glucosidasa no hubo diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre el tratamiento de ácido sulfúrico con 172.10 U/mg de proteína total y el de alternancia de temperatura 35 °C/25 °C con 171.71 U/mg de proteína total, aunque los picos de las actividades fueron a las 120 y 36 h de germinación (Figura 4.4b). En el tratamiento de ácido sulfúrico se relacionó de manera positiva la actividad de β -glucosidasa y el PG debido a que a medida que se incrementó el porcentaje de germinación aumentó la actividad enzimática (Figura 4.2a y 4.4b).

En *C. longirostrata* la actividad de α -D-galactosidasa estuvo asociada al PG. En el tratamiento de inmersión en agua a 80 °C 1 min se presentó el mayor porcentaje de germinación a las 72 y 120 h (48.67 y 55.56 %, respectivamente), mientras que la mayor actividad de esta enzima se presentó a la hora 72 con 82 624.2 U/mg de proteína total (Figura 4.5). Con el tratamiento de inmersión en

ácido sulfúrico por 15 min, la actividad de α -D-galactosidasa presentó una actividad de 54 595.22 U/mg de proteína total a las 72 h, esta concentración se relacionó positivamente con el PG de las semillas (45.11 %). La degradación de los compuestos de reserva galactomananos se realizó justo antes de que se llevara a cabo el proceso de germinación para proveer de energía al embrión y promover la protrusión de la radícula. En la hora 120, ambos tratamientos presentaron cerca o más del 50 % de germinación, justo cuando la actividad enzimática descendió considerablemente. Lo que indica que una vez germinada la semilla, disminuye la actividad de α -D-galactosidasa.

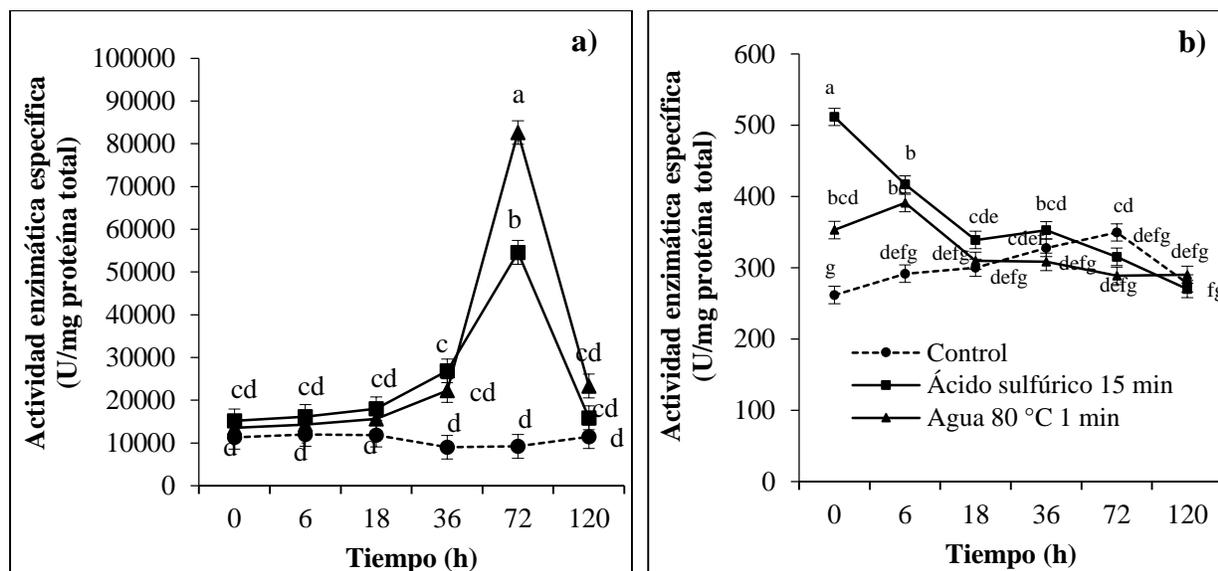


Figura 4.5. Actividad enzimática específica de α -D-galactosidasa (a) y β -glucosidasa (b) en semillas de *C. longirostrata* bajo tratamientos pre-germinativos. Letras diferentes por enzima son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

De la misma manera, la mayor concentración de actividad de β -glucosidasa se halló en las semillas tratadas con ácido sulfúrico en el tiempo 0 con 511.35 U/mg de proteína total. Esto quiere decir que la escarificación promovió la expresión de la enzima de la semilla aún cuando no había germinación. Conforme transcurrió el tiempo de germinación, la actividad de la enzima disminuyó; efecto contrario se observó con α -D-galactosidasa (Figura 4.5b).

4.5. DISCUSIÓN

4.5.1. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje y velocidad de germinación

La imbibición de agua de la semilla es el primer paso para estimular el metabolismo durante la germinación (Fase I) y que posteriormente ocurra la emergencia de la radícula. En semillas con latencia física, la impermeabilidad de la testa es la principal limitante para que esta fase se inicie. Para saber si la testa de las semillas en estudio era permeable o impermeable al agua, se comparó la absorción de agua de las semillas escarificadas con diferentes tratamientos pre-germinativos con las no escarificadas. En *L. exaltatus*, se observó la mayor absorción de agua en las semillas tratadas con ácido sulfúrico al 98 % durante 15 min. Los tratamientos de choque térmico y alternancia de temperatura no superaron al control. Estudios en semillas de *M. bimucronata* tratadas con ácido sulfúrico al 98 % durante 10 min presentaron una curva de absorción de agua similar a *L. exaltatus*. Las semillas tratadas de *M. bimucronata* pasaron directamente de la fase I (absorción rápida de agua) a la fase III (protrusión de la radícula, incremento de humedad) (Kestring *et al.*, 2009). El cambio de las fases de absorción de agua (I a III) en *M. bimucronata* se presentó a las 11 h y en *L. exaltatus* a las 36 h. En el control, ambas especies mostraron en la fase I baja absorción de agua. Las semillas no tratadas presentaron un ligero incremento a partir de la hora 36 alcanzando el límite de absorción a las 120 horas. Aunque, estudios con esta misma especie han presentado una máxima hidratación a las 12 h, cuando la escarificación es realizada mecánicamente (Pablo-Pérez *et al.*, 2013). El tratamiento ácido también mejoró la absorción de agua en las semillas de *C. longirostrata*. Sin embargo, la curva de mayor absorción de agua se presentó en semillas tratadas con agua a 80 °C durante 1 min. Estudios en semillas de *L. leucocephala* cv. Cunningham tratadas con agua a 80 °C durante 2 min presentaron un patrón trifásico normal, la fase I finalizó a las 8 h, en la fase II se presentó un segmento estacionario de absorción de agua hasta las 25 h y la fase III se alcanzó a las 30 horas de hidratación (Sánchez *et al.*, 2005). Entre los factores que pudieran estar afectando la absorción de agua en las semillas sin escarificación de *L. exaltatus*, está la dureza de la testa que puede variar dependiendo de la humedad relativa y temperatura durante la maduración de la semilla, y su grosor (Pablo-Pérez *et al.*, 2013). Tanto las semillas de *L. exaltatus* como de *C. longirostrata* necesitan ser escarificadas para incrementar la absorción de agua y llevar a cabo cambios metabólicos para el proceso de germinación.

Los tratamientos pre-germinativos con ácido para reblandecer la testa tuvieron un efecto significativo sobre el PG y VG en las dos especies. El PG de *L. exaltatus* fue de 30.95 % a las 120 h después de siembra con el tratamiento de ácido sulfúrico al 98 %. En estudios con *L. leptophyllus* la aplicación de éste ácido promovió un 15 % de germinación a las 120 h (Alderete-Chávez *et al.*, 2010a). En otras especies se ha empleado este tratamiento con ácido, pero con mayor tiempo de exposición y días de germinación, por lo que el porcentaje es mayor al que se obtuvo en este estudio. En semillas de *L. campestris* el ácido sulfúrico también rompió la latencia, pero con 90 minutos de exposición, alcanzando un máximo de 50 % a los 30 dds (Gutiérrez-Nava *et al.*, 2010). En *Astragalus arpilobus*, con 30 min de exposición se obtuvo 94 % de germinación con régimen de temperatura 20 °C/10 °C a los 28 dds (Long *et al.*, 2012).

En *L. exaltatus*, los tratamientos de choque de calor y alternancia de temperatura quedaron por debajo del control. Sin embargo, en *L. succulentus* el tratamiento de choque de calor a 90 °C durante 5 min favoreció el PG total con 19.5 ± 2.1 % pero cuando se incrementó la temperatura a 120 °C, la germinación disminuyó a 1.5 ± 0.9 % a los 28 dds (Hanley *et al.*, 2001). En ecosistemas propensos a fuego, la germinación de las semillas puede ser provocada por el choque térmico, humo, ceniza y madera carbonizada, por ello Zuloaga-Aguilar *et al.* (2010) aplicaron tratamientos de choque térmico a diferentes especies que crecen en zonas propensas a quemas accidentales del estado de Jalisco, México, entre ellas *L. exaltatus*. Ésta especie mostró liberación de latencia física cuando se expuso a altas temperaturas, debido a que en el choque de calor a 150 °C 1 min presentó 93.3 % (Zuloaga-Aguilar *et al.*, 2011) de germinación a las 7 semanas. Si se comparan con los resultados observado con las semillas de *L. exaltatus* colectadas en el estado de Puebla, parece que ésta especie muestra variabilidad intraespecífica para la tolerancia a altas temperaturas.

La VG por efecto de los tratamientos pre-germinativos en *L. exaltatus* únicamente fue significativa para el tratamiento de ácido sulfúrico al 98 % 15 min. Lo que concuerda con lo observado en otras especies, como *Ormosia arborea*, donde la aplicación de ácido sulfúrico durante 30 min incrementó la VG (Pereira *et al.*, 2011).

Los tratamientos pre-germinativos aplicados a la especie *C. longirostrata* que promovieron la germinación fueron ácido sulfúrico al 98 % durante 15 min (47.89 %) y agua a 80 °C durante 1 min (55.56 %). Diferentes estudios en *Crotalaria* sp., han mostrado un efecto positivo del uso del tratamiento con ácido para liberar latencia en las especies de éste género. En *C. retusa* con 20 min

de exposición en ácido se alcanzó el 20 % de germinación usando un régimen de temperatura de 32 °C/18 °C a los 5 dds (Alderete-Chávez *et al.*, 2010b). En otras especies de *Crotalaria*, se han alcanzado porcentaje de germinación final de 69 % con este mismo tratamiento, pero con la variación en el tiempo de inmersión (2 minutos) y la temperatura de 25 °C/30 °C (Reino *et al.*, 2011). Semillas de *Crotalaria* sp. cv. Derecha han mostrado una germinación final de 62.6 % cuando fue expuesta a agua 80 °C durante dos min, también demostraron que esta especie a pesar de tener más de 12 años de almacenamiento mostró una buena respuesta germinativa (Muñoz *et al.*, 2009). En otras especies de leguminosas como *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham, el tratamiento de agua caliente con 2 min de exposición presentó 55.6 % de germinación a los 15 días (Sánchez *et al.*, 2005).

4.5.2. Actividad enzimática específica en la semilla entera y sus componentes

La enzima con mayor actividad específica en las semillas de ambas especies fue α -D-galactosidasa. En otros estudios, la enzima α -D-galactosidasa se ha detectado en alta cantidad en semillas maduras de varias especies de plantas, pero se incrementa con la imbibición y germinación de la semilla, ya que está implicada en la degradación del polisacárido de reserva galactomanano. En semillas secas de *Tachigali multijuga* Benth., se encontró actividad de α -galactosidasa en una concentración > 6 nKat mg⁻¹ de proteína, es decir 0.359 999 U/mg de proteína (Fialho *et al.*, 2008), concentración menor a las obtenidas en las semillas secas de *C. longirostrata* y *L. exaltatus* (11 375.53 y 6 409.38 U/mg⁻¹ de proteína, respetivamente). Semillas maduras de *Tabebuia velanadae* y *Cedrela fissilis* presentaron una actividad específica de 0.51 y 0.44 mM min⁻¹ mg⁻¹ respectivamente (De Oliveira *et al.*, 2005). Por otra parte, Plant y Moore (1982) purificaron esta enzima a partir de cotiledones de semillas secas de *L. angustifolius* con una actividad específica de 14.2 nM mg⁻¹ de proteína (0.0142 U/mg de proteína), inferior a la encontrada en los cotiledones de *C. longirostrata*: 17 196.18 y a la de *L. exaltatus*: 8 869.77 U/mg⁻¹ de proteína. En las testas de semillas endospermicas, *Sesbania virgata*, la actividad es alta, pero incrementó conforme el tiempo de imbibición alcanzando la máxima actividad al tercer día (Tonini *et al.*, 2007).

La enzima β -glucosidasa se expresó en menor concentración en comparación a la α -D-galactosidasa. Esta tiene la función de degradar la pared celular del endospermo durante la germinación y en defensa de la planta frente a estrés biótico (Singh *et al.*, 2016), también hidroliza enlaces glucosídicos para liberar glucosa e hidroliza isoflavona para liberar agliconas. En

cotiledones de soya se encontró una actividad específica de 0.0017 U/mg de proteína (Santos *et al.*, 2011) valor inferior al encontrado en los cotiledones de *C. longirostrata* y *L. exaltatus* (610.30 y 113.32 U/mg de proteína, respectivamente). Sin embargo, en cotiledones de soya BRS 213 se expresó en cerca de 120 U/g peso seco de cotiledón (Ribeiro *et al.*, 2006). En semillas de *Prunus domestica* se observó actividad específica de 0.4 U/mg de proteína (Chen *et al.*, 2012) valor inferior a los que presentaron *L. exaltatus* y *C. longirostrata*.

Las enzimas β -1,3-glucanasa y α -amilasa se encontraron con baja actividad. Sin embargo, la β -1,3-glucanasa se expresó en mayor concentración en las semillas y componentes de *C. longirostrata*. Se ha demostrado que esta enzima es una proteína vacuolar antifúngica implicada en la defensa de la planta y también tiene una función durante la germinación de semillas dicotiledóneas (Vögeli-Lange *et al.*, 1994; Minic y Jouanin, 2006). En cotiledones de chícharo no tratados con etileno la actividad enzimática de β -1,3-glucanasa fue < 0.01 pKat/ μ g de proteína, mientras que, los tratados no mostraron diferencias respecto al control a las 12 h de germinación (Petruzzelli *et al.*, 1999). Estos resultados son menores a los obtenidos en este estudio: 0.01 y 0.003 U/mg de proteína (*C. longirostrata* y *L. exaltatus*). Esta enzima también se ha expresado en el endospermo de semillas de tomate después de la protrusión de la radícula (Morohashi y Matsushima, 2000; Wu *et al.*, 2001), probablemente a esto se deba la máxima actividad de β -1,3-glucanasa en la testa de las semillas de *C. longirostrata* (especie endospermica).

La actividad específica de α -amilasa fue de baja a nula en los diferentes componentes de las semillas de ambas especies. Esta enzima cataliza la hidrólisis de enlaces glucosídicos α -1 \rightarrow 4 de polisacáridos como el almidón, glucógeno, o sus productos de degradación. En *Glicine max*, la máxima actividad fue detectada a las 60 h de imbibición con 0.96 U/mg de proteína total y después de las 60 h declinó drásticamente (Kumari *et al.*, 2010). En *Vigna mungo*, se expresó en los cotiledones durante la germinación de las semillas, específicamente en las vacuolas líticas de las células, los gránulos de almidón son transportados en las vacuolas a través de autofagia para ser hidrolizados por la α -amilasa vacuolar (Toyooka *et al.*, 2001). También, se han purificado isoformas de α -amilasa, formas diferentes de la misma proteína, aislada de cotiledones en germinados de *Vigna angularis* (San Mar *et al.*, 2003). Así mismo, en cotiledones de *Phaseolus mungo* se detectó una ligera actividad amilolítica en el día 1 de imbibición que incrementó progresivamente hasta el día 4 durante la germinación (Minamikawa y Koshiba, 1979). En semillas

de *Vigna radiata* var. *radiata* expuestas por 45 min a un campo magnético estático mostraron alto PG (63 %) y actividad enzimática total de $19.2 \mu\text{M mL}^{-1}$ de α -amilasa (Venkateswar *et al.*, 2012).

4.5.3. Efecto de diferentes tratamientos para reblandecer la testa sobre la actividad enzimática específica de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa

La β -glucosidasa presentó mayor actividad a la hora cero después de la aplicación de los tratamientos de escarificación en *C. longirostrata*, mientras que en *L. exaltatus* los picos más altos se encontraron a la hora 36 y 120 con los pre-tratamientos alternancia de temperatura $35\text{ }^{\circ}\text{C}/25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y H_2SO_4 , 98 %. De acuerdo a los resultados obtenidos, la actividad de β -glucosidasa no tuvo una relación positiva con el PG. Aunque, se ha mencionado que ésta enzima está implicada en la germinación y en respuesta de defensa contra estrés biótico (Singh *et al.*, 2016; Minic y Jouanin, 2006). En cambio la actividad de α -D-galactosidasa si se relacionó con el porcentaje de germinación.

Durante la primera fase de la germinación, la rafinosa disminuye sustancialmente e incrementa la actividad enzimática de α -D-galactosidasa. Esto es indispensable para que los alimentos a base de soya tengan una amplia aprobación ya que de los azúcares solubles aproximadamente el 40 % corresponde a los oligosacáridos de la rafinosa en la semilla (Monteze *et al.*, 2001; De Fátima *et al.*, 2005; Kadlec *et al.*, 2008) y 16 % en *L. luteus* (Zalewski *et al.*, 2010). La degradación de estos azúcares ocurre durante la imbibición y es más intensa en los cotiledones y el eje embrionario durante la germinación. La desaparición de los α -galactósidos es más rápida en el eje embrionario que en los cotiledones (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2008).

En *C. longirostrata*, la enzima mostró mayor actividad a las 72 h después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos. En *L. exaltatus*, a las 36 h de germinación con el tratamiento de H_2SO_4 , 98 % con $9\ 521.37\ \text{U/mg}$ de proteína total. En ambas especies, la actividad tuvo una relación positiva con el porcentaje de germinación. También, en *Tachigali multijuga*, la actividad de α -galactosidasa se incrementó durante la germinación alcanzando el máximo nivel a las 108 h después de imbibición con una actividad específica de aproximadamente $18\ \text{nKat mg}^{-1}$. Además, tiene la capacidad de hidrolizar tanto los azúcares rafinosa como estaquiosa y galactomananos ya que a medida que incrementó la actividad de α -galactosidasa disminuyeron los polisacáridos rafinosa y estaquiosa (Fialho *et al.*, 2008). Estos α -galactósidos también disminuyen después de 2

o 3 días de germinación en semillas de *Lens culinaris*, relacionado con la máxima actividad de α -galactosidasa en el día 3 con < 1 U/g de semillas germinadas (Petrova *et al.*, 2010). Después de tres días de germinación en agua, los oligosacáridos de la familia de la rafinosa desaparecieron del tejido axial de semillas *Vicia villosa* Roth. (Lahuta y Goszczyńska, 2009) y a los 7 días de germinación desaparecieron todos los α -D-galactósidos del eje embrionario y los cotiledones, quedando como carbohidratos solubles: glucosa, fructosa, sacarosa, D-pinitol y mio inositol en los tejidos de las plántulas (Lahuta y Górecki, 2011), al igual que en *Dalbergia nigra* Vell. (Carrijo *et al.*, 2010). En *Platymiscium pubescens*, la actividad de α -galactosidasa incrementó conforme el tiempo de germinación siendo el valor máximo a las 72 h con < 0.15 mM min⁻¹ mg⁻¹ de proteína comportamiento similar a *C. longirostrata*, mientras que las especies *Vigna umbellata*, *Glycine max* y *Pisum sativum* mostraron ligeros cambios a través del tiempo de germinación, la actividad de α -galactosidasa no rebasó los 0.06 mM min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (De Oliveira *et al.*, 2005).

4.6. CONCLUSIONES

Las semillas de *C. longirostrata* y *L. exaltatus* presentan alta actividad constitutiva de α -D-galactosidasa, seguida de la β -glucosidasa, β -1,3-glucanasa y α -amilasa, éstas dos últimas en muy baja concentración. Los tratamientos pre-germinativos con H₂SO₄, 98 % 15 min y H₂O 80 °C 1 min reblandecieron la testa de semillas de *C. longirostrata* y *L. exaltatus* permitiendo la absorción de agua. También incrementaron el PG, VG y actividad de α -D-galactosidasa. La mayor actividad de ésta enzima se observó en los tratamientos pre-germinativos donde se incrementó el PG, sobre todo en *C. longirostrata*, por lo que ésta enzima parece estar implicada en la germinación de la semilla de las especies en estudio.

4.7. LITERATURA CITADA

Acosta-Percástegui, J., and D. A. Rodríguez-Trejo. 2005. Factors affecting germination and pregerminative treatments of *Lupinus montanus* seeds. *Interciencia*. 30: 576-579.

Alderete-Chávez, A., D. A. Rodríguez-Trejo, V. Espinosa-Hernández, E. Ojeda-Trejo, and N. de la Cruz-Landero. 2010a. Effects of different scarification treatments on the germination of *Lupinus leptophyllus* seeds. *International Journal of Botany*. 6: 64-68.

Alderete-Chávez, A., L. Aguilar-Marín, N. de la Cruz Landero, J. J. Guerra-Santos, R. Brito, E. Guevara, and R. Gelabert. 2010b. Effects of scarification chemical treatments on the germination of *Crotalaria retusa* L. seeds. *Journal of Biological Sciences*. 10: 541-544.

Aniszewski, T. 2010. Comparison of catecholase (PPO) activity in whole seeds and their components (testa, cotyledon and embryo) of four legume species from genus *Lupinus*. *Legume Research*. 33: 157 -163.

Atencio, L., R. Colmenares, M. Ramírez-Villalobos, y D. Marcano. 2003. Tratamientos pregerminativos en acacia San Francisco (*Peltophorum pterocarpum*) Fabaceae. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*. 20: 63-71.

Bello, G. D., B. E. Carrera, y M. Y. Díaz. 2006. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). 2: 45-50.

Bewley, J. D., K. Bradford, H. Hilhorst, and H. Nonogaki. 2013. *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*, 3rd. ed. Springer Science & Business Media. pp: 141-151.

Blöchl, A., T. Peterbauer, J. Hofmann, and A. Richter. 2008. Enzymatic breakdown of raffinose oligosaccharides in pea seeds. *Planta*. 228: 99-110.

Buckeridge, M. S. 2010. Seed cell wall storage polysaccharides: Models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiology*. 154: 1017-1023.

- Carrijo, L. C., E. E. de Lima E. Borges, C. Aparecida Pontes, M. Rocha Lopes, and A. Brune. 2010. α -galactosidase activity and carbohydrate mobilization in seeds of *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. Fabaceae (Brazilian rosewood) during germination. *Cerne, Lavras*. 16: 283-289.
- Chen, L., N. Li, and M.-H. Zong. 2012. A glucose-tolerant β -glucosidase from *Prunus domestica* seeds: Purification and characterization. *Process Biochemistry*. 47: 127-132.
- De Fátima, V. S, V. Monteze G., I. Chamel J., M. G. de Almeida e O., N. M. Brunoro C., E. Goncalves de B., M. Alves M., and S. Tavares de R. 2005. Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean α -galactosidase. *Food Chemistry*. 93: 665-670.
- Dehghanpour, F. H., R. Tavakkol A., F. Sharifzadeh, and S. Chavoshinasab. 2011. Germination improvement and α -amylase and β -1, 3-glucanase activity in dormant and non-dormant seeds of Oregano (*Origanum vulgare*). *Australian Journal of Crop Science*. 5: 421-427.
- De Moraes, L. F., J. C. C. Almeida, B. B. Deminicis, F. T. de Pádua, Mirton J. F. Morenz, J. B. R. de Abreu¹, R. P. Araujo, and D. D. de Nepomuceno. 2014. Methods for breaking dormancy of seeds of tropical forage legumes. *American Journal of Plant Sciences*. 5: 1831-1835.
- De Oliveira, G., V. Monteze G., E. E. de Lima e B., L. D. S. Fialho, M. G. de Almeida e O., and S. Tavares de R. 2005. Purification and characterization of α -galactosidases from *Platymiscium pubescens* Micheli seeds. *Árvore*. 29: 535-543.
- Elliott, C. W., D. G. Fischer, and C. J. LeRoy. 2011. Germination of three native *Lupinus* species in response to temperature. *Northwest Scientific Association*. 85: 403-410.
- Fialho, D. S. L., G. V. Monteze, C. C. Marin, R. A. Pataro, B. D. Silveira, B. E. Euclides de Lima, M. M. Alves, and R. S. Tavares. 2008. Characterization and biotechnological application of an acid α -galactosidase from *Tachigali multijuga* Benth. seeds. *Phytochemistry*. 69: 2579-2585.

- Gallardo, K., C. Job, S. P. C. Groot, M. Puype, H. Demol, J. Vandekerckhove, and D. Job. 2002. Proteomics of *Arabidopsis* seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiology*. 129: 823-837.
- Gerardi, C., F. Blando, A. Santino, and G. Zacheo. 2001. Purification and characterisation of a β -glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. *Plant Science* 160: 795-805.
- Gutiérrez-Nava, P., F. De León-González, J. Etchevers-Barra, and A. Casas-Fernández. 2010. Effect of scarification, self-inhibition, and sowing depth on seed germination of *Lupinus campestris*. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 70: 365-371.
- Hanley, M. E., M. Fenner, and G. Ne'eman. 2001. Pregermination heat shock and seedling growth of fire-following Fabaceae from four Mediterranean-climate regions. *Acta Oecologica*. 22: 315-320.
- Herrera, J., R. Alizaga, E. Guevara, y V. Jiménez. 2006. Germinación y crecimiento de la planta. *In: Fisiología de la producción de los cultivos tropicales*. Universidad de Costa Rica. pp: 18-28.
- Kestring, D., J. Klein, L. C. Ribeiro de M., and M. Nogueira-Rossi. 2009. Imbibition phases and germination response of *Mimosa bimucronata* (Fabaceae: Mimosoideae) to water submersion. *Aquatic Botany*. 91: 105-109.
- Kadlec, P., J. Dostálová, J. Bernášková, and M. Skulinová. 2008. Degradation of α -galactosides during the germination of grain legume seeds. *Czech Journal of Food Sciences*. 26: 99-108.
- Kimura, E., and M. A. Islam. 2012. Seed scarification methods and their use in forage legumes. *Research Journal of Seed Science*. 5: 38-50.

- Kumari, A., V. Kumar Singh, J. Fitter, T. Polen, and A. M. Kayastha. 2010. α -amylase from germinating soybean (*Glycine max*) seeds-purification, characterization and sequential similarity of conserved and catalytic amino acid residues. *Phytochemistry*. 71: 1657-1666.
- Lahuta, L. B., and R. J. Górecki. 2011. Raffinose in seedlings of winter vetch (*Vicia villosa* Roth.) under osmotic stress and followed by recovery. *Acta Physiologiae Plantarum*. 33: 725-733.
- Lahuta, L. B., and J. Goszczyńska. 2009. Inhibition of raffinose family oligosaccharides and galactosyl pinitols breakdown delays germination of winter vetch (*Vicia villosa* Roth.) seeds. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 78: 203-208.
- Leubner-Metzger, G. 2003. Functions and regulation of β -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Science Research*. 13: 17-34.
- Long, Y., D. Y. Tan, C. C. Baskin, and J. M. Baskin. 2012. Seed dormancy and germination characteristics of *Astragalus arpilobus* (Fabaceae, subfamily Papilionoideae), a central Asian desert annual ephemeral. *South African Journal of Botany*. 83: 68-77.
- Markwell, M. A. K., S. M. Haas, L. L. Bieber, and N. E. Tolbert. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*. 87: 206-210.
- Martínez-Villaluenga, C., J. Frias, and C. Vidal-Valverde. 2008. Alpha-Galactosides: Antinutritional factors or functional ingredients? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48: 301-316.
- Mauch, F., L. A. Hadwiger, and T. Boller. 1984. Ethylene: Symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiology*. 76: 607-611.

- Minamikawa, T., and T. Koshiba. 1979. Histochemical studies on mobilization of storage components in cotyledons of germinating *Phaseolus mungo* seeds. *The Botanical Magazine*. 92: 325-332.
- Minic, Z., and L. Jouanin. 2006. Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 44: 435-449.
- Monteze, G. V., S. Tavares de R., M. Alves M., E. Goncalves de B., and C. R. Felix. 2001. Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. *Phytochemistry*. 58: 67-73.
- Morohashi, Y., and H. Matsushima. 2000. Development of β -1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds. *Journal of Experimental Botany*. 51: 1381-1387.
- Muñoz, C. B., J. A. Sánchez, L. A. Montejo, Y. González y J. Reino. 2009. Valoración germinativa de 20 accesiones de leguminosas almacenadas en condiciones desfavorables. *Pastos y Forrajes*. 32: 1-15.
- Pablo-Pérez, M., L. C. Lagues-Espinoza, J. López-Upton, J. Ramos-Juárez, y E. M. Aranda-Ibáñez. 2013. Morfometría, germinación y composición mineral de semillas de *Lupinus silvestres*. *Bioagro*. 25: 101-108.
- Pereira, G. E., F. Sales de Jesús S., S. dos Santos S., D. de Souza T., J. Silva V., and B. C. Clifton C. 2011. Dormancy breaking in *Ormosia arborea* seeds. *International Journal of Agronomy*. 2011: 1-5.
- Petrova, T., M. Marinova, and B. Tchorbanov. 2010. Dynamics of some hydrolytic enzymes during the sprouts production from lentil seeds (*Lens culinaris*). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 24: 2102-2107.

Petruzzelli, L., C. Kunz, R. Waldvogel, F. Meins Jr., and G. Leubner-Metzger. 1999. Distinct ethylene- and tissue-specific regulation of β -1,3-glucanases and chitinases during pea seed germination. *Planta*. 209: 195-201.

Piotrowicz-Cieślak A. I., D. J. Michalczyk, K. Górska, Z. Bulińska-Radomska, R. J. Górecki. 2008. Physiological-biochemical parameters and characteristics of seed coat structure in lupin seeds subjected to long storage at different temperatures. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 77: 201-205.

Plant, R. A., and K. G. Moore. 1982. α -D-mannosidase and α -D-galactosidase from protein bodies of *Lupinus angustifolius* cotyledons. *Phytochemistry*. 21: 985-989.

Reino, J., J. A. Sánchez, B. Muñoz, Y. González, y L. Montejo. 2011. Efecto combinado de la escarificación y la temperatura en la germinación de semillas de leguminosas herbáceas. *Pastos y Forrajes*. 34: 179-184.

Ribeiro, Reis R. C., B. França D., R. Delmondez de C., C. G. Cardoso A., F. F. Santos D. S., and C. R. Pelacani. 2011. Reserve mobilization during imbibition of stored *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud. (Leguminosae-Papilionoideae) seeds. *Revista Brasileira de Sementes*. 33: 549-560.

Ribeiro, M. L. L., J. M. G. Mandarino, M. C. Carrão-Panizzi, M. C. N. Oliveira, and C. B. H. Campo, A. L. Nepomuceno, and E. I. Ida. 2006. β -glucosidase activity and isoflavone content in germinated soybean radicles and cotyledons. *Journal of Food Biochemistry*. 30: 453-465.

Romano, A., J. Arguello, I. Teves, N. De Pascuale, G. Oddone, y L. Cazón. 2014. Daño mecánico en semillas de dos cultivares de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.), impacto sobre la fisiología de la germinación. *IDESIA*. 32: 17-25.

Ross, G. S., R. J. Redgwell, and E. A. MacRae. 1993. Kiwifruit β -galactosidase: isolation and activity against specific fruit cell wall polysaccharides. *Planta*. 189: 499-506.

Sánchez, J. A., J. Reino, B. Muñoz, Y. González, L. Montejo, and R. Machado. 2005. Efecto de los tratamientos de hidratación-deshidratación en la germinación, la emergencia y el vigor de plántulas de *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham. *Pastos y Forrajes*. 28: 209-220.

San Mar, S., H. Mori, J. L., K. Fukuda, W. Saburi, A. Fukuhara, M. Okuyama, S. Chiba, and A. Kimura. 2003. Purification, characterization, and sequence analysis of two α -amylase isoforms from Azuki Bean, *Vigna angularis*, showing different affinity towards β -Cyclodextrin sepharose. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 67: 1080-1093.

Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. Vol. 3. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Buffers. pp: A1.5.

Santos, R. F., C. F. Oliveira, G. S. Varéa, M. L. C. Orradi Da Silva, E. I. Ida, J. M. G. Mandarino, M.C. Carrão-Panizzi, and M. L. L. Ribeiro. 2011. Purification and characterization of soy cotyledon β -glucosidase. *Journal of Food Biochemistry*. 37: 302-312.

SAS Institute. 2010. SAS System for Windows, Release 9.3, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.

Scott, S. J., A. R. Jones, and A. W. Williams. 1984. Review of data analysis methods for seed germination. *Crop Science*. 24: 1192-1198.

Silveira, S. F., and G. E. Overbeck. 2013. Effect of high temperature on germination of four legumes from a forest-grassland mosaic in Southern Brazil. *Biota Neotropica*. 13: 331-335.

Singh, G., A. K. Verma, and V. Kumar. 2016. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. *3 Biotech*. 6: 1-14.

Smykal, P., V. Vernoud, M. Blair, A. Soukup, and R. Thompson. 2014. The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science*. 5: 1-19.

Tiryaki, I., and M. Topu. 2014. A novel method to overcome coat-imposed seed dormancy in *Lupinus albus* L. and *Trifolium pratense* L. *Journal of Botany*. 2014: 1-6.

Tonini, P. P., C. G. S. Lisboa, C. O. Silva, S. C. Mazzoni-Viveiros, and M. S. Buckeridge. 2007. Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. *Trees*. 21: 13-21.

Toyooka, K., T. Okamoto, and T. Minamikawa. 2001. Cotyledon cells of *Vigna mungo* seedlings use at least two distinct autophagic machineries for degradation of starch granules and cellular components. *The Journal of Cell Biology*. 154: 973-982.

Venkateswar, R. K., S. Raisa R., S. Jareena, and M. Nagaraju. 2012. Exposure of greengram seeds (*Vigna radiate* var. *radiata*) to static magnetic fields: Effects on germination and α -amylase activity. *Research Journal of Seed Science*. 5: 106-114.

Vögeli-Lange, R., C. Fründt, C. M. Hart, R. Beffa, F. Nagy, and F. Meins Jr. 1994. Evidence for a role of β -1,3-glucanase in dicot seed germination. *The Plant Journal*. 5: 273-278.

Wu, C., G. Leubner-Metzger, F. Meins, Jr., and K. J. Bradford. 2001. Class I β -1,3-glucanase and chitinase are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiology*. 126: 1299-1313.

Zalewski, K., B. Nitkiewicz, L. B. Lahuta, K. Głowacka, A. Socha, and R. Amarowicz. 2010. Effect of jasmonic acid–methyl ester on the composition of carbohydrates and germination of yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology*. 167: 967-973.

Zuloaga-Aguilar, S., O. Briones, and A. Orozco-Segovia. 2010. Effect of heat shock on germination of 23 plant species in pine-oak and montane cloud forests in western Mexico. *International Journal of Wildland Fire*. 19: 759-773.

Zuloaga-Aguilar, S., O. Briones, and A. Orozco-Segovia. 2011. Seed germination of montane forest species in response to ash, smoke and heat shock in Mexico. *Acta Oecologica*. 37: 256-262.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

5.1. Conclusiones generales

Los regímenes de temperatura promovieron la germinación en ambas especies, especialmente la de las semillas de *L. exaltatus*, donde el mayor PG y VG se presentaron en el régimen de temperatura constante de 25 °C. En *C. longirostrata* en el régimen de 30 °C/20 °C.

La VG no presentó diferencias significativas entre los regímenes de temperaturas.

La actividad de las enzimas α -D-galactosidasa y β -glucosidasa fue afectada por los regímenes de temperatura. En *L. exaltatus*, la α -D-galactosidasa con el régimen 7 días a 5 °C seguido de 20 °C/20 °C; y β -glucosidasa en el régimen de 20 °C/15 °C. En *C. longirostrata*, la mayor actividad, ambas enzimas, se presentó en el régimen de 20 °C/15 °C. No se observó relación entre PG y actividad enzimática por efecto de régimen de temperatura.

La actividad enzimática específica en las semillas y de sus componentes (cotiledones y testa) varió entre especies y enzimas. La enzima que se expresó en mayor concentración fue α -D-galactosidasa en ambas especies, seguida de β -glucosidasa. Sin embargo fue en *C. longirostrata* donde se observó la mayor actividad de ambas enzimas. La actividad de β -1,3-glucanasa y α -amilasa fue muy baja, inferior a 0.1 U/mg de proteína en ambas especies.

Los tratamientos pre-germinativos promovieron la absorción de agua, el PG y VG de las especies en estudio. Los tratamientos H₂SO₄, 98 % 15 min y H₂O 80 °C 1 min fueron los que incrementaron la imbibición de agua, el PG y VG en *L. exaltatus* y *C. longirostrata*, respectivamente.

La actividad de las enzimas α -D-galactosidasa y β -glucosidasa fue afectada por los tratamientos pre-germinativos; a medida que incrementó el PG se aumentó la actividad de α -D-galactosidasa. En *C. longirostrata*, la mayor actividad de esta enzima se observó en el tratamiento de H₂O 80 °C 1 min y en *L. exaltatus* con el tratamiento H₂SO₄, 98 % 15 min.

No se observó relación entre actividad de β -glucosidasa y PG después de la aplicación de los tratamientos pre-germinativos. La mayor actividad de la enzima se observó en el tratamiento

H₂SO₄, 98 % 15 min en *C. longirostrata*, mientras que en *L. exaltatus* se presentó en el tratamiento de alternancia de temperatura 35 °C/25 °C.

5.2. Perspectivas

Para que *C. longirostrata* y *L. exaltatus* puedan ser aprovechadas bajo un sistema de producción que les dé valor agregado se requiere continuar el estudio de las mismas en diferentes aspectos científicos. Algunos temas que se derivan del presente trabajo son:

1. La caracterización bioquímica y purificación de la enzima α -D-galactosidasa, la cual estuvo implicada en la germinación de ambas especies y que tiene uso potencial en la industria alimentaria y farmacéutica.
2. Determinar la relación entre concentración de polisacáridos de la familia de la rafinosa durante las primeras horas de imbibición de las semillas de estas especies y actividad enzimática.
3. Realizar estudios de expresión de las enzimas involucradas.
4. Conocer qué otros tratamientos pre-germinativos de fácil manejo y económicos pueden reblandecer la testa de las semillas e incrementar el porcentaje de germinación.
5. Caracterizar la calidad de plántula y crecimiento de *C. longirostrata* y *L. exaltatus* después de aplicar los tratamientos que incrementaron germinación.

ANEXOS

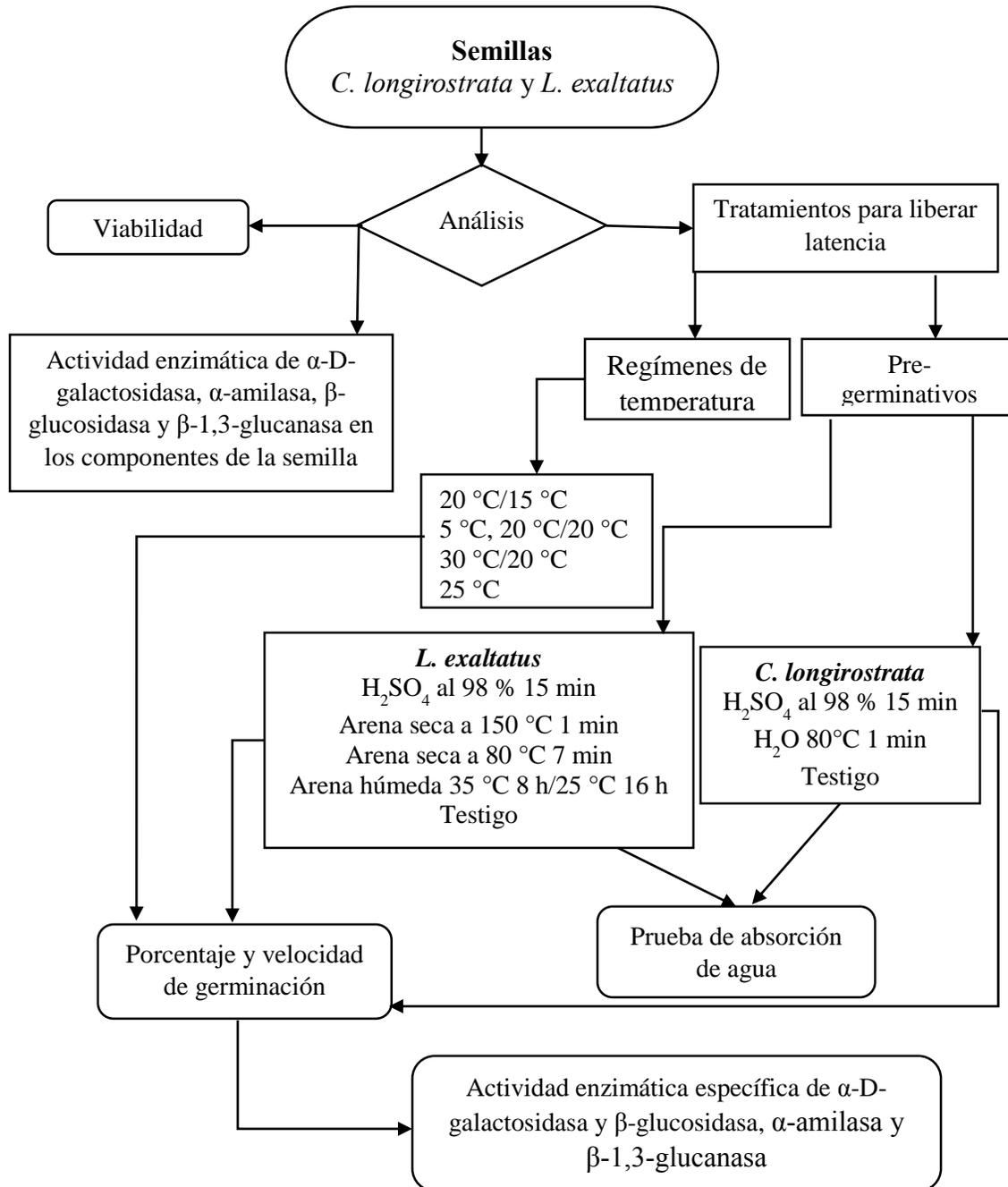


Figura 1. Diagrama de flujo de los experimentos para el porcentaje y velocidad de germinación, y actividad enzimática de semillas de *C. longirostrata* y *L. exaltatus*.

Anexos A. Regímenes de temperatura sobre el porcentaje, velocidad de germinación y actividad enzimática de semillas de *L. exaltatus* y *C. longirostrata*.

Cuadro 1A. Análisis de varianza para la actividad enzimática específica en los componentes de la semilla de *L. exaltatus*.

Fuente de variación	Grados de libertad (gL)	Cuadrado medio			
		α -D-galactosidasa	β -glucosidasa	α -amilasa	β -1,3-glucanasa
Componente	2	9 937 672**	1 234.0**	2.8E-06 **	6.8E-06 ***
Error	6	743 520	25.6	1.1E-07	1.1E-07

* ($p \leq 0.05$); ** ($p \leq 0.01$); *** ($p \leq 0.0001$).

Cuadro 2A. Medias de la actividad enzimática específica en los componentes de las semillas de *L. exaltatus*.

Componente	Enzimas			
	α -D-galactosidasa	β -glucosidasa	α -amilasa	β -1,3-glucanasa
Semilla entera	6 409.38 b	116.07 a	-	1.7E-03 b
Cotiledón	8 869.77 a	113.32 a	-	3.0E-03 a
Testa	5 316.32 b	79.65 b	1.7E-03 a	-

Letras diferentes por enzima son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 3A. Análisis de varianza para la actividad enzimática específica en los componentes de las semillas de *C. longirostrata*.

Fuente de variación	Grados de libertad (gL)	Cuadrado medio			
		α -D-galactosidasa	β -glucosidasa	α -amilasa	β -1,3-glucanasa
Componente	2	27 372 096**	231 580***	2.1E-04***	4.6E-03***
Error	6	1 613 120	663	8.9E-07	5.3E-06

** ($p \leq 0.01$); *** ($p \leq 0.0001$).

Cuadro 4A. Medias de la actividad enzimática específica en los componentes de las semillas de *C. longirostrata*.

Componente	Actividad enzimática específica (U/mg proteína total)			
	α -D-galactosidasa	β -glucosidasa	α -amilasa	β -1,3-glucanasa
Semilla entera	11 375.53 b	261.59 c	0 b	0.01 b
Cotiledón	17 196.18 a	610.30 b	6.7E-04 b	0.01 c
Testa	15 686.60 a	810.63 a	0.01 a	0.08 a

Letras diferentes por enzima son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 5A. Efecto de temperatura de germinación sobre el porcentaje y velocidad de germinación de *L. exaltatus* y *C. longirostrata*.

Temperatura	Porcentaje de germinación (%)	Velocidad de germinación (semillas día ⁻¹)
<i>L. exaltatus</i>		
25 °C	25.92a	0.68a
30 °C/20 °C	5.71c	0.14c
20 °C/15 °C	16.52b	0.40b
5 °C, 20°C/20 °C	8.15c	0.25bc
<i>C. longirostrata</i>		
25 °C	5.69a	0.21a
30 °C/20 °C	6.11a	0.20a
20 °C/15 °C	3.03b	0.13a
5 °C, 20 °C/20 °C	4.44ab	0.14a

Letras diferentes por especie y enzima son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 6A. Efecto de tiempo de germinación sobre el porcentaje y velocidad de germinación en *L. exaltatus* y *C. longirostrata*.

Tiempo (días)	Porcentaje de germinación (%)	Velocidad de germinación (semillas día ⁻¹)
<i>L. exaltatus</i>		
5	10.00b	0.55a
10	13.21ab	0.38ab
15	15.51a	0.30b
20	17.59a	0.25b
<i>C. longirostrata</i>		
5	2.53b	0.21a
10	4.94a	0.20a
15	5.42a	0.15a
20	6.39a	0.13a

Letras diferentes por enzima son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 7A. Efecto de temperatura de germinación sobre la actividad enzimática de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en *L. exaltatus* y *C. longirostrata*.

Temperatura	α -D-galactosidasa (U/mg proteína total)	β -glucosidasa (U/mg proteína total)
<i>L. exaltatus</i>		
25 °C	6 975.27 b	185.66 b
30 °C/20 °C	4 602.89 c	203.68 ab
20 °C/15 °C	10 012.41 a	215.66 a
5 °C, 20 °C/20 °C	10 547.53 a	187.04 b
<i>C. longirostrata</i>		
25 °C	11 417.61 c	406.39 b
30 °C/20 °C	9 595.05 c	439.18 b
20 °C/15 °C	16 162.37 a	539.30 a
5 °C, 20 °C/20 °C	14 104.48 b	428.18 b

Letras diferentes por especie y enzima son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 8A. Efecto de tiempo de germinación sobre la actividad enzimática de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en *L. exaltatus* y *C. longirostrata*.

Tiempo (días)	α -D-galactosidasa (U/mg proteína total)	β -glucosidasa (U/mg proteína total)
<i>L. exaltatus</i>		
5	7 826.5 a	180.5 b
10	8 309.8 a	200.5 ab
15	7 947.8 a	197.8 ab
20	8 053.8 a	213.0 a
<i>C. longirostrata</i>		
5	13 231.6 a	460.5 a
10	13 378.8 a	453.9 a
15	13 149.2 a	466.9 a
20	11 519.8 a	431.6 a

Letras diferentes por enzima son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 9A. Efecto de la temperatura a través del tiempo de germinación sobre la actividad enzimática de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en *L. exaltatus* y *C. longirostrata*.

	Temperatura	Tiempo (días)			
		5	10	15	20
<i>L. exaltatus</i>					
α -D-galactosidasa	25 °C	6 491.3bc	6 900.3 bc	7 248.12 b	7 261.28 b
	30 °C/20 °C	4 988.7 cd	5 012.3 cd	3 936.19 d	4 474.26 d
	15 °C/20 °C	9 801.8 a	10 212.5 a	9 958.14 a	10 077.06 a
	5 °C, 20 °C/20 °C	10 024.2 a	11 113.9 a	10 649.12 a	10 402.73 a
β -glucosidasa	25 °C	181.4 cd	192.6 cd	100.5 e	267.9 ab
	30 °C/20 °C	159.3 de	172.6 cde	280.2 a	202.5 bcd
	15 °C/20 °C	193.5 bcd	246.3 abc	220.2 abcd	202.4 bcd
	5 °C, 20 °C/20 °C	188.0 cd	190.3 cd	190.4 cd	179.3 cd
<i>C. longirostrata</i>					
α -D-galactosidasa	25 °C	12 195.1bcde	11 240.8bcde	10 809.6bcde	11 424.7bcde
	30 °C/20 °C	10 213.6cde	11 378.4bcde	10 082.7de	6 705.3e
	20 °C/15 °C	15 747.8abc	16 290.7ab	20 357.8a	12 252.9bcde
	5 °C, 20 °C/20 °C	14 769.8bcd	14 605.2bcd	11 346.7bcde	15 696.1abc
β -glucosidasa	25 °C	405.1def	351.6ef	432.5bcdef	436.2bcdef
	30 °C/20 °C	509.7bcd	424.5cdef	411.7def	410.5def
	15 °C/20 °C	458.4bcde	630.5a	531.5abc	536.6ab
	5 °C, 20 °C/20 °C	468.6bcd	410.5def	491.8bcd	343.1f

Letras diferentes por especie y enzima son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

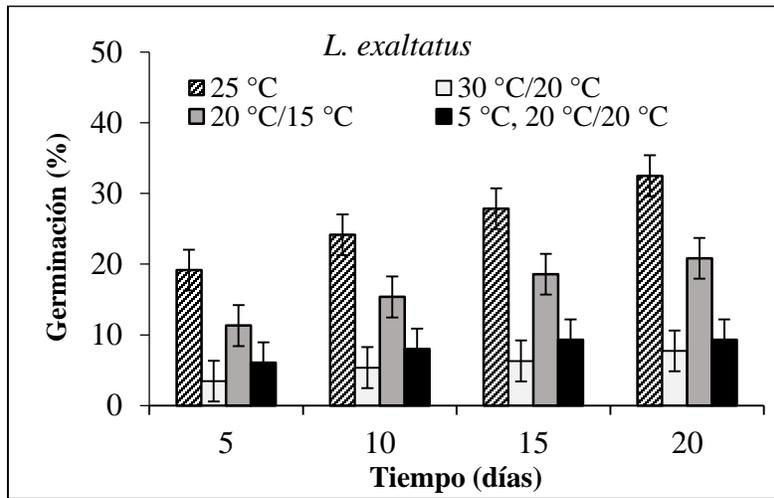


Figura 1A. Porcentaje de germinación de semillas de *L. exaltatus* bajo cuatro regímenes de temperatura.

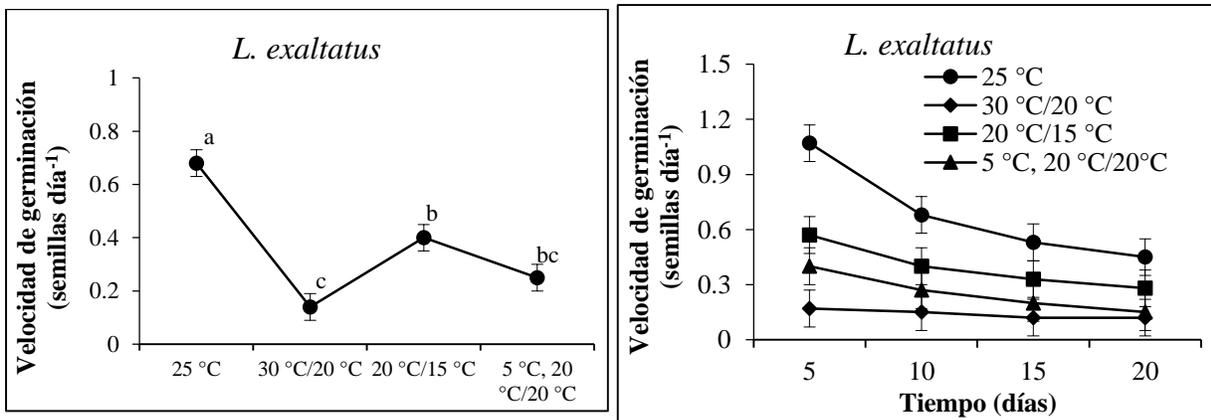


Figura 2A. Velocidad de germinación de semillas de *L. exaltatus* bajo cuatro regímenes de temperatura.

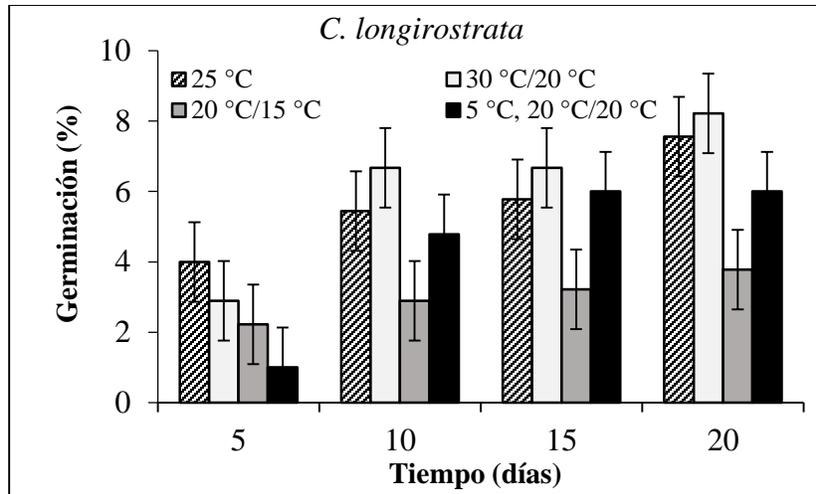


Figura 3A. Porcentaje de germinación de semillas de *C. longirostrata* bajo cuatro regímenes de temperatura.

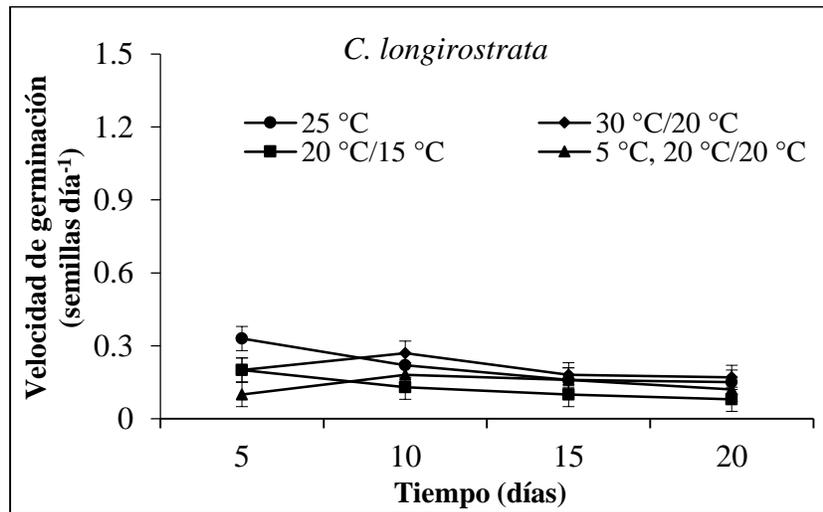


Figura 4A. Velocidad de germinación de semillas de *C. longirostrata* bajo cuatro regímenes de temperatura.

Anexos B. Tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje, velocidad de germinación y actividad enzimática de semillas de *L. exaltatus* y *C. longirostrata*.

Cuadro 1B. Medias para la cantidad de agua absorbida (g) de las semillas de *L. exaltatus* después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos.

Tratamiento	Tiempo de absorción de agua (h)						Media
	0	6	18	36	72	120	
Control	0.07 e	0.08 cde	0.10 cde	0.11 bcde	0.11 cde	0.13 bcd	0.10b
H ₂ SO ₄ 15 min	0.08 cde	0.11 bcde	0.13 bcd	0.13 bc	0.16 ab	0.20 a	0.13a
Arena seca 80 °C 7 min	0.08 de	0.08 de	0.09 cde	0.10 cde	0.10 cde	0.11 bcde	0.09b
Arena seca 150 °C 1 min	0.07 e	0.07 e	0.07 e	0.07 e	0.07 e	0.07 e	0.07c
Arena húmeda 35 °C/25 °C	0.09 cde	0.09 cde	0.09 cde	0.09 cde	0.10 cde	0.11 bcde	0.09b
Media	0.08d	0.09cd	0.10bc	0.10bc	0.11ab	0.12a	

Letras diferentes por filas y columnas para los tiempos de absorción de agua son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$). Entre tratamientos y entre horas, letras diferentes son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 2B. Medias para la cantidad de agua absorbida (g) de las semillas de *C. longirostrata* después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos.

Tratamiento	Tiempo de absorción de agua (h)						Media
	0	6	18	36	72	120	
Control	0.05 c	0.05 c	0.05 bc	0.06 bc	0.06 bc	0.07 bc	0.06 b
H ₂ SO ₄ 15 min	0.05 c	0.06 bc	0.06 bc	0.07 bc	0.09 bc	0.12 abc	0.08 ab
H ₂ O 80 °C 1 min	0.05 c	0.05 bc	0.07 bc	0.08 bc	0.13 ab	0.19 a	0.09 a
Media (h)	0.05c	0.05c	0.06bc	0.07bc	0.09ab	0.12a	

Letras diferentes por filas y columnas son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$). Entre tratamientos y entre horas, letras diferentes son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 3B. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje y velocidad de germinación de *L. exaltatus*.

Tratamiento	Porcentaje de germinación (%)	Velocidad de germinación (semillas h ⁻¹)
Control	3.79b	0.02b
H ₂ SO ₄ 15 min	11.88a	0.04a
Arena 80 °C 7 min	1.60bc	0.01a
Arena 150 °C 1 min	0.17c	3.3E-04b
Arena húmeda 35 °C/25 °C	3.60b	0.02b

Letras diferentes por variable son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 4B. Efecto del tiempo sobre el porcentaje y velocidad de germinación en *L. exaltatus* por la aplicación de tratamientos pre-germinativos.

Tiempo de germinación (h)	Porcentaje de germinación (%)	Velocidad de germinación (semillas h ⁻¹)
6	0.17d	0.01b
18	0.33d	4.0E-03b
36	3.41c	0.03a
72	6.60b	0.03a
120	10.52a	0.03a

Letras diferentes por variable son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 5B. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje y velocidad de germinación de *L. exaltatus*.

Tratamiento	Tiempo de germinación (h)				
	6	18	36	72	120
PG (%)					
Control	0d	0d	4.05cd	5.95cd	8.93c
H ₂ SO ₄ 15 min	0d	0d	7.02cd	21.43b	30.95a
Arena 80 °C 7 min	0.83d	0d	0.48d	2.14cd	4.52cd
Arena 150 °C 1 min	0d	0d	0d	0d	0.83d
Arena húmeda 35 °C/25 °C	0d	1.67cd	5.48cd	3.45cd	7.38cd
VG (semillas h⁻¹)					
Control	0d	0d	0.03bcd	0.03bcd	0.02cd
H ₂ SO ₄ 15 min	0d	0d	0.05abc	0.09a	0.07ab
Arena 80 °C 7 min	0.03bcd	0d	0.01d	0.01d	0.01cd
Arena 150 °C 1 min	0d	0d	0d	0d	1.7E-03d
Arena húmeda 35 °C/25 °C	0d	0.02cd	0.03bcd	0.01cd	0.02cd

Letras diferentes por variable son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 6B. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje y velocidad de germinación de *C. longirostrata*.

Tratamiento	Porcentaje de germinación (%)	Velocidad de germinación (semillas h ⁻¹)
Control	2.11b	0.01c
H ₂ SO ₄ 15 min	27.02a	0.19a
H ₂ O 80 °C 1 min	25.09a	0.14b

Letras diferentes por variable son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 7B. Efecto del tiempo sobre el porcentaje y velocidad de germinación en *C. longirostrata* por la aplicación de tratamientos pre-germinativos.

Tiempo de germinación (h)	Porcentaje de germinación (%)	Velocidad de germinación (semillas h ⁻¹)
6	0c	0d
18	3.48c	0.07cd
36	18.22b	0.21a
72	32.22a	0.18ab
120	36.44a	0.12bc

Letras diferentes por variable son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 8B. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje y velocidad de germinación de *C. longirostrata*.

Tratamiento	Tiempo de germinación (h)				
	6	18	36	72	120
PG (%)					
Control	0d	0d	1.78d	2.89d	5.89d
H ₂ SO ₄ 15 min	0d	9.33cd	32.78b	45.11ab	47.89a
H ₂ O 80 °C 1 min	0d	1.11d	20.11c	48.67a	55.56a
VG (semillas h⁻¹)					
Control	0d	0d	0.02cd	0.02cd	0.02cd
H ₂ SO ₄ 15 min	0d	0.19b	0.37a	0.24ab	0.16bc
H ₂ O 80 °C 1 min	0d	0.02cd	0.24ab	0.27ab	0.19b

Letras diferentes por variable son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 9B. Efecto de la aplicación de tratamientos pre-germinativos sobre la actividad enzimática de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa durante la germinación de *L. exaltatus*.

Tratamiento	α -D-galactosidasa (U/mg proteína total)	β -glucosidasa (U/mg proteína total)
Control	6724.7 b	116.4 ab
H ₂ SO ₄ 15 min	7372.7 a	116.5ab
Arena 80 °C 7 min	7721.7 a	111.1 b
Arena 150 °C 1 min	864.1 c	19.8 c
Arena húmeda 35 °C/25 °C	7272.1 ab	137.0 a

Letras diferentes por enzima son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 10B. Efecto del tiempo de germinación sobre la actividad enzimática de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en *L. exaltatus* por la aplicación de tratamientos pre-germinativos.

Tiempo de germinación (h)	α -D-galactosidasa (U/mg proteína total)	β -glucosidasa (U/mg proteína total)
0	5722.21 bc	78.35 b
6	6187.26 abc	93.82 ab
18	6272.03 ab	93.70 ab
36	6510.49 a	117.57 a
72	5544.99 c	104.00 a
120	5709.73 bc	113.83 a

Letras diferentes por enzima son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 11B. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la actividad enzimática de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa durante la germinación de *L. exaltatus*.

Tratamiento	Tiempo de germinación (h)					
	0	6	18	36	72	120
α-D-galactosidasa (U/mg proteína total)						
Control	6 448.4 cd	6 929.9bcd	6 836.6bcd	6 707.5bcd	6 351.9cd	7 074.1bcd
H ₂ SO ₄ 15 min	6 679.0bcd	7 879.1abc	8 495.9ab	9 521.3a	6 328.0cd	5 332.9d
Arena 80 °C 7 min	7 688.7abc	7 839.0abc	8 257.6abc	8 222.0abc	7 421.6bc	6 901.4bcd
Arena 150 °C 1 min	490.2e	605.4e	439.9e	942.4e	792.9e	1 913.9e
Arena húmeda 35 °C/25 °C	7 304.7bcd	7 682.7abc	7 329.9bc	7 159.0bcd	6 830.3bcd	7 326.2bc
β-glucosidasa (U/mg proteína total)						
Control	116.0bcd	127.3abc	114.9abcd	118.7abcd	129.3abc	92.4bcde
H ₂ SO ₄ 15 min	79.0cdefg	92.4bcde	107.3abcd	122.4abc	126.2abc	171.7a
Arena 80 °C 7 min	85.8bcde	84.1bcdef	124.6abc	152.9ab	118.1abcd	101.3abcd
Arena 150 °C 1 min	9.6gh	23.0efgh	13.6fgh	21.6efgh	2.9h	47.8defgh
Arena húmeda 35 °C/25 °C	101.1abcd	142.0abc	107.9abcd	172.1a	143.3abc	155.7ab

Letras diferentes por enzima son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 12B. Efecto de la aplicación de tratamientos pre-germinativos sobre la actividad enzimática de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en *C. longirostrata*.

Tratamiento	α -D-galactosidasa (U/mg proteína total)	β -glucosidasa (U/mg proteína total)
Control	10808.7c	301.3c
H ₂ SO ₄ 15 min	24447.4b	367.4a
H ₂ O 80 °C 1 min	28612.3a	323.3b

Letras diferentes por enzima son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 13B. Efecto del tiempo de germinación sobre la actividad enzimática de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa en *C. longirostrata* después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos.

Tiempo de germinación (h)	α -D-galactosidasa (U/mg proteína total)	β -glucosidasa (U/mg proteína total)
0	13 351.9b	375.2a
6	14 159.9b	366.3a
18	15 172.9b	316.1b
36	19 367.9b	329.4b
72	48 801.3a	317.7b
120	16 882.9b	279.2c

Letras diferentes por enzima son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Cuadro 14B. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la actividad enzimática de α -D-galactosidasa y β -glucosidasa durante la germinación de *C. longirostrata*.

Tratamiento	0	6	18	36	72	120
α -D-galactosidasa (U/mg proteína total)						
Control	11 339.1d	12 012.9d	11 860.2d	8 999.3d	9 184.6d	11 456.0d
H ₂ SO ₄ 15 min	15 176.0cd	16 180.2cd	18 015.5cd	26 850.5c	54 595.2b	15 867.2cd
H ₂ O 80 °C 1 min	13 540.4cd	14 286.5cd	15 643.0cd	22 254.1cd	82 624.2a	23 325.3cd
β -glucosidasa (U/mg proteína total)						
Control	261.5g	291.5defg	299.8defg	327.6cde	349.4cd	277.8efg
H ₂ SO ₄ 15 min	511.3a	416.6b	338.8cde	352.4bcd	315.2defg	269.8fg
H ₂ O 80 °C 1 min	352.8bcd	390.7bc	309.6defg	308.1defg	288.4defg	289.9defg

Letras diferentes por enzima son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).