



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**BIOQUÍMICA DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Lupinus* POR
APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS FÍSICOQUÍMICOS**

Edna Irene Bautista Rodríguez

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2016


La presente tesis, titulada: **Bioquímica de la germinación de semillas de *Lupinus* por aplicación de tratamientos fisicoquímicos**, realizada por la alumna: **Edna Irene Bautista Rodríguez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

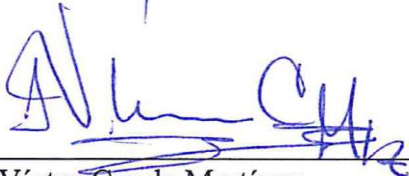
MAESTRA EN CIENCIAS
PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

Consejera: 
Dra. Luz del Carmen Lagunes Espinoza

Asesor: 
Dr. Francisco Marcelo Lara Viveros

Asesor: 
Dr. Mepivoseth Castelán Estrada

Asesor: 
Dr. F. Víctor Conde Martínez

H. Cárdenas, Tabasco, a 26 de septiembre de 2016

BIOQUÍMICA DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Lupinus* POR APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS FÍSICOQUÍMICOS

Edna Irene Bautista Rodríguez

Colegio de Postgraduados, 2016

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de cuatro regímenes de temperaturas (15-10°C, 20-15°C, 25-25°C y 35-25°C) y siete pretratamientos físicos y químicos sobre el porcentaje, tasa de germinación (PG y TG) y la evolución bioquímica de semillas de *L. exaltatus*, *L. campestris* y *L. montanus*. Los pretratamientos fueron H₂SO₄ 15 min, Arena húmeda 80°C 5min, Alternancia de temperaturas en arena húmeda: 35°C 8h- 25°C 16h, Secado en arena 80°C 7 min, Secado en arena 150°C 1 min, Arena húmeda 80°C 1 min y H₂O 80°C 1 min. A los 0, 3, 5, 10 y 15 días después de siembra (dds), se evaluaron los contenidos de proteína soluble, aminoácidos, azúcares solubles totales, azúcares reductores, polifenoles totales y ácido absícico (ABA). Los resultados muestran que los regímenes de alternancias de temperaturas día/noche no incrementaron el PG más del 10%, ni la TG en las tres especies. El régimen 35-25°C redujo la germinación de *L. montanus* a solo 2%. El mayor incremento en germinación fue por efecto del régimen 20-15°C en las tres especies; en este mismo régimen también se incrementó la concentración de proteína y azúcares reductores. Un incremento significativo en la germinación se observó cuando las semillas fueron pretratadas con agua a 80°C 1 min, con un régimen de 20°/15°C y fotoperiodo de 12 h. La germinación fue de 41% para *L. exaltatus*, y de 69% *L. campestris*. En el caso de *L. montanus* el pretratamiento con ácido sulfúrico concentrado fue el mejor (PG de 37%). Este pretratamiento también incrementó significativamente la TG de las tres especies en estudio (2.22 semillas día⁻¹). Durante la germinación, después de la aplicación de los tratamientos pre-germinativos, se observaron aumentos en los contenidos de proteína, aminoácidos, azúcares reductores y polifenoles, mientras que la concentración de azúcares solubles totales se redujo; la mayor movilización de las reservas se observó en el día 5. La concentración de ABA también disminuyó después de la aplicación del tratamiento con agua a 80°C 1 min en las tres especies.

Palabras clave: Leguminosas, latencia, germinación, agua caliente, proteína, azúcares solubles.

BIOCHEMISTRY OF *Lupinus* SEED GERMINATION BY APPLICATION OF PHYSIC AND CHEMISTRY TREATMENTS

Edna Irene Bautista Rodríguez

Colegio de Postgraduados, 2016

The aim of this study was to evaluate the effect of four temperature regimes (15-10°C, 20-15°C, 25-25°C and 35-25°C), and seven physical and chemical pretreatments on the percentage and rate of germination (GP and GR) and biochemical changes of *L. campestris*, *L. exaltatus* and *L. montanus* seeds. The pretreatments were H₂SO₄ 15 min, Wet sand 80°C 5 min, Alternating temperatures and wet sand: 35°C 8h-25°C 16h, Dry sand 80°C 7 min, Dry sand at 150°C 1 min, Wet sand 80°C 1 min, and H₂O 80°C 1 min. The content of soluble protein, amino acids, total soluble sugars, reducing sugars, total polyphenols and abscisic acid (ABA) were evaluated at 0, 3, 5, 10, 15 days after seedling (das). The results showed that alternating day/night temperatures did not increase more than 10% PG, or TG in the three species. The regime of 35-25°C reduced the germination of *L. montanus* to 2%. The largest increase in germination was by effect of 20-15°C regime in the three species. In this regime, the concentration of protein and reducing sugar was also increased. Seeds of *L. exaltatus* and *L. campestris* increased significantly their germination (41% and 69%, respectively) when were pretreated with water at 80°C 1 min, at 20°-15°C regime and 12 h photoperiod. In the case of *L. montanus*, pretreatment with concentrated sulfuric acid was the best (GP of 37%). This pretreatment also significantly increased the GR of the three species studied (2.22 seeds day⁻¹). During germination, the contents of protein, amino acids, reducing sugars and polyphenol increased after application of pretreatments where germination was higher, while the concentration of total soluble sugars reduced. This increase in the mobilization of reserves was observed on day 5 after sowing. ABA concentration decreased after pretreatment application with water at 80°C 1 min in all three species.

Key words: Leguminosas, dormancy, germination, protein, soluble sugars, hot water.

El presente trabajo de investigación fue financiado por el proyecto CONACYT: CB-2012-01 181428; y por el apoyo a la investigación otorgado al proyecto con clave 467 según registro en la matriz de investigación del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco.

Forma parte de la Línea Generadora y de Aplicación del Conocimiento (LGAC-2): Sistemas sustentables de producción agrícola y pecuaria del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico (PROPAT); y de la LGAC-CP-2.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría en Ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento brindado para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias en el Programa de Producción Agroalimentaria en el Trópico; y de mi investigación de tesis a través del proyecto CB-2012-01 181428.

A la Dra. Luz del Carmen Lagunes Espinoza, Profesora Investigadora Titular del Campus Tabasco, por aceptarme como su estudiante, por brindarme sus conocimientos, el tiempo dedicado a mi formación, sus consejos, por su paciencia, el apoyo en cada etapa del trabajo y principalmente por su amistad y por ser motivo de inspiración para sus estudiantes.

Al Dr. Francisco M. Lara Viveros por su apoyo en la realización de este trabajo, por la motivación para continuar con mis estudios y por su amistad.

Al Dr. Mepivoseth Castelán Estrada por sus consejos, el apoyo, el tiempo dedicado y las sugerencias para la realización de esta investigación.

Al Dr. Víctor Conde Martínez por sus consejos, sugerencias, por haberme recibido en el campus Montecillo y el tiempo dedicado en más de una ocasión.

A los estudiantes de servicio social que me apoyaron en las diferentes etapas de la investigación: Karla, Gonzalo y Lizbeth, gracias chicos.

A la Dra. Araceli Hernández por su apoyo y amistad.

A los Doctores con los cuales tuve la fortuna de recibir clases en la maestría, por sus valiosos consejos y su amistad.

Al personal de servicios escolares por su ayuda en todos los trámites de la maestría, gracias.

A Eduardo Martínez Acosta, por tu paciencia, por tu manera de hacerme ver las cosas cuando estoy mal y enseñarme a ver el lado positivo de todo, por tu ayuda en cada etapa de este trabajo y por estar conmigo en las buenas y en las malas, te quiero mucho.

Gracias a todos...

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios por las bendiciones que día a día me brinda, por la vida que me ha regalado y las personas que ha puesto en ella.

A mis padres Rodrigo Bautista Soto y Juana Rodríguez Hernández porque sin importar la situación siempre están conmigo, por darme sin reservas lo mejor de sí mismos, porque ustedes son ejemplo de perseverancia y porque sé que siempre que los necesite estarán ahí. Dios los bendiga siempre.

A mi tía Angélica Rodríguez Hernández, porque más que una tía eres mi mamá ya que siempre has estado conmigo desde mis primeros pasos, por enseñarme constantemente el camino correcto, por tus consejos y el amor de mamá que siempre me has brindado. Te amo tía.

A mi tío Pablo Alamilla Bautista, por ser siempre un ejemplo a seguir por enseñarme que no importa la situación siempre debemos salir adelante, por tus consejos y los momentos de diversión por ser un gran tío y amigo.

A mis amados hermanos Luis, Karen, Isaac, Abilene, Cristal y Alondra porque siempre están ahí cuando nos necesitamos, porque he aprendido a valorarlos más desde que estamos lejos, los amo hermanos, este trabajo es por y para ustedes. Nada es imposible si de verdad lo quieres lograr.

A mis amados sobrinos nuevos integrantes de la familia Fernanda y Hernán y sus padres Bety y Alexis por su apoyo.

A la gran familia Bautista Soto por ser motivo de orgullo y felicidad para mí.

A mis compañeros y amigos de la maestría por la convivencia y el apoyo: Eduardo, Yansi, Moisés, Raúl, Lili, Gaby, Manuel, Rebeca, Bety, Nadia, Félix, Magín, Itzel y Blanca. Gracias amigos.

Contenido

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Introducción general.....	1
1.2. Objetivo general	3
1.2.1. Objetivos particulares.....	3
1.3. Hipótesis.....	3
1.4. Literatura citada.....	4
CAPITULO II	8
REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1. Importancia de las leguminosas	8
2.2. El género <i>Lupinus</i>	9
2.2.1. Distribución en México.....	10
2.2.2. Producción y usos del género <i>Lupinus</i>	10
2.2.3. Composición química.....	11
2.3. La germinación.....	12
2.4.1. Proteínas	14
2.4.2. Carbohidratos	15
2.4.3. Aminoácidos.....	17
2.4.4. Ácido absícico (ABA).....	18
2.4.5. Polifenoles.....	19
2.5. Concepto de latencia y clasificación	20
2.6. Latencia y sus implicaciones en germinación y desarrollo de cultivos	21
2.7. Latencia en el género <i>Lupinus</i>	21
2.7.1. Métodos para debilitar la testa en semillas de <i>Lupinus</i>	22
2.8. Literatura citada.....	24
CAPITULO III	34
EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL PORCENTAJE, TASA DE GERMINACIÓN Y BIOQUÍMICA DE SEMILLAS DE <i>Lupinus</i> spp.	34
3.1. Introducción	34
3.2. Materiales y métodos	35

3.2.1. Análisis bioquímicos	38
3.3. Resultados y Discusión	41
3.3.1. Prueba de viabilidad	41
3.3.2. Curvas de imbibición	42
3.3.3. Porcentaje de germinación (PG).....	43
3.3.4. Tasa de Germinación (TG).....	47
3.3.5. Análisis bioquímicos	47
3.3.5.1. Proteína Soluble	48
3.3.5.2. Aminoácidos Libres (AA).....	50
3.3.5.3. Azúcares Solubles Totales (AST)	52
3.3.5.4. Azúcares reductores (AR)	54
3.3.5.5. Polifenoles totales (PFT).....	56
3.4. Conclusiones	59
3.5. Literatura citada	60
CAPITULO IV	65
EFFECTO DE TRATAMIENTOS PRE-GERMINATIVOS SOBRE EL PORCENTAJE, TASA DE GERMINACIÓN Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA EN SEMILLAS DE <i>Lupinus</i> spp.	65
4.1. Introducción	65
4.2. Materiales y Métodos	66
4.2.1. Análisis bioquímicos	68
4.3. Resultados y Discusión	73
4.3.1 Curvas de imbibición	73
4.3.2. Efecto de los tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje y tasa de germinación (PG y TG)	74
4.3.3. Composición Bioquímica	78
4.3.3.1. Proteína Soluble	79
4.3.3.2. Aminoácidos Libres (AA).....	81
4.3.3.3. Azúcares Solubles Totales (AST)	84
4.3.3.4. Azúcares Reductores (AR).....	86
4.3.3.5. Polifenoles Totales (PFT).....	88
4.3.3.6. Ácido Abscísico (ABA).....	93
4.4. Conclusiones	94
4.5. Literatura citada.....	95
CAPÍTULO V	102

Conclusiones generales y Recomendaciones	102
5.1. Conclusiones generales	102
5.2. Recomendaciones.....	103
VI. ANEXOS	104

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 2.1. Composición química de las semillas de <i>Lupinus</i> (% de materia seca) comparada con soya.....	12
Cuadro 2.2. Composición de aminoácidos (g AA /16 g N) en semillas de <i>Lupinus</i> y Soya.	¡Error! Marcador no definido.
Cuadro 2.3. Tratamientos físicos y químicos aplicados a semillas del género <i>Lupinus</i> sp.....	23
Cuadro 3.1. Temperaturas promedio de máximas, mínimas y precipitación por estación del año, en la región de los Valles de Serdán y Libres, Puebla, México de 2012-2015.	35
Cuadro 3.2. Análisis de varianza de diferentes regímenes de temperatura y el tiempo sobre el porcentaje y tasa de germinación (semillas día ⁻¹) en semillas de <i>Lupinus</i>	44
Cuadro 3.3. Tasa de germinación de especies de <i>Lupinus</i> por efecto de régimen de Tratamiento de temperatura.	47
Cuadro 3.4. Análisis de varianza del efecto de la especie y el tiempo sobre el contenido de proteína soluble en diferentes especies.	48
Cuadro 3.5. Efecto de diferentes regímenes de temperaturas sobre la concentración de proteína durante la germinación (0, 5, 10, 15 dds) de <i>Lupinus</i> spp (mg g ⁻¹ de PS).....	49
3.3.5.2. Aminoácidos Libres (AA).....	50
Cuadro 3.6. Análisis de varianza del efecto de la temperatura sobre la concentración de Aminoácidos libres durante la germinación.	50
Cuadro 3.7. Efecto de la temperatura sobre la concentración de Aminoácidos (mg g ⁻¹ PS) durante 0, 5, 10, 15 días después de siembra en semillas de <i>Lupinus</i> bajo distintos regímenes de temperaturas.	51
Cuadro 3.8. Análisis de varianza del efecto de la temperatura sobre la concentración de azúcares solubles totales en tres especies de <i>Lupinus</i> durante la germinación.	52
Cuadro 3.9. Efecto de la temperatura sobre la concentración de azúcares solubles totales (mg g ⁻¹ PS) a los 0, 5, 10 y 15 días después de siembra en <i>Lupinus</i> spp.....	54
Cuadro 3.10. Análisis de varianza del efecto de la temperatura sobre la concentración de Azúcares Reductores durante la germinación en tres especies de <i>Lupinus</i> spp.	55
Cuadro 3.11. Efecto de la temperatura sobre la concentración de Azúcares Reductores (mg g ⁻¹ PS) a los 0, 5, 10 y 15 días después de siembra en semillas de <i>Lupinus</i> spp.	56
3.3.5.5. Polifenoles totales (PFT).....	56
Cuadro 3.12. Análisis de varianza del efecto de la temperatura sobre la concentración de polifenoles totales en tres especies de <i>Lupinus</i> , durante la germinación.....	57
Cuadro 3.13. Efecto de la temperatura sobre la concentración de polifenoles totales (mg g ⁻¹ PS) durante 0, 5, 10 y 15 días después de siembra en <i>Lupinus</i> spp.	59
Cuadro 4.1. Análisis de varianza del efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la imbibición (ganancia de peso, mg ⁻¹) de semillas de <i>Lupinus</i>	73

Cuadro 4.2. Análisis de varianza del porcentaje y tasa de germinación (semillas día ⁻¹) en tres especies de <i>Lupinus</i> sp. después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos.	75
Cuadro 4.3. Análisis de varianza del efecto de los tratamientos pre-germinativos y el tiempo de germinación sobre la concentración de proteína, aminoácidos (AA), azúcares reductores (AR), polifenoles totales (PFT) y azúcares solubles (AS) en tres especies de <i>Lupinus</i>	79
Cuadro A1. Concentraciones de BSA para preparar curva de calibración en la determinación de proteína.....	104
Cuadro A2. Concentraciones de Glucosa para preparar curva de calibración en la determinación de Azúcares Solubles.	104
Cuadro A3. Concentraciones de Glucosa para curva de calibración en la determinación de Azúcares Reductores.	105
Cuadro A5. Concentraciones de Leucina para preparar curva de calibración en la determinación de aminoácidos.....	106
Cuadro A6. Concentración de Ácido Gálico para la curva de calibración en la determinación de Polifenoles Totales.	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 2.2. Fases del proceso de germinación de las semillas (Nonogaki <i>et al.</i> , 2010; Bewley <i>et al.</i> , 2013).	13
Figura 2.3. Comparación de dos patrones de movilización de proteínas almacenadas en el eje y en los cotiledones de una semilla dicotiledónea durante y después de la germinación (Bewley <i>et al.</i> , 2013).	15
Figura 2.4. Estructura de un aminoácido (Tymoczko <i>et al.</i> , 2014).	17
Figura 3.1. Diagrama de flujo de experimento.....	37
Figura 3.2. Semillas de <i>L. montanus</i> (A) viable y semilla de <i>L. campestris</i> (B) poco viable determinada mediante la aplicación topográfica con tetrazolio.	42
3.3.2. Curvas de imbibición	42
Figura 3.3. Efecto de regímenes de temperatura sobre la ganancia de peso (imbibición) de semillas de <i>Lupinus</i> a las 0, 8, 24, 36, 48, 96, 120 h. A) <i>L. exaltatus</i> , B) <i>L. campestris</i> , C) <i>L. montanus</i>	43
Figura 3.4. Promedio del porcentaje de germinación de tres especies de <i>Lupinus</i> bajo diferentes regímenes de temperatura. Medias con una letra común por especie no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).	45
Figura 3.5. Efecto de diferentes regímenes de temperatura sobre el porcentaje de germinación a los 5, 10 y 15 dds. Medias con una letra común por régimen de temperatura no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).	46
Figura 3.6. Efecto de regímenes de temperaturas sobre la concentración de proteína soluble (mg g^{-1} PS) en semillas de <i>Lupinus</i> spp durante la germinación.	49
Figura 3.7. Efecto del régimen de temperatura durante la germinación sobre la concentración final de aminoácidos libres (mg g^{-1} PS) en tres especies de <i>Lupinus</i> spp.....	51
Figura 3.8. Efecto de alternancias de temperatura sobre la concentración promedio de Azúcares Solubles Totales (mg g^{-1} PS) en tres especies de <i>Lupinus</i> . Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).	53
Figura 3.9. Efecto del régimen de temperatura durante la germinación sobre la concentración promedio de azúcares reductores (mg g^{-1} PS) en tres especies de <i>Lupinus</i> . Medias con una letra común por especie no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).	55
Figura 3.11. Semillas de <i>L. exaltatus</i> (A), <i>L. montanus</i> (B), <i>L. campestris</i> (C).	57
Figura 3.10. Efecto del régimen de temperatura sobre la concentración final de Polifenoles Totales (mg g^{-1} PS) durante la germinación de tres especies de <i>Lupinus</i> . Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).	58
Figura 4.1. Ganancia de peso en semillas (mg^{-1}) de <i>Lupinus</i> sp. después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos.	74

Figura 4.2. Efecto de la aplicación de tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje de germinación en semillas de <i>L. exaltatus</i> (A), <i>L. campestris</i> (B).	76
Figura 4.3. Efecto de la aplicación de tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje de germinación en semillas de <i>L. montanus</i>	77
Figura 4.4. Efecto de los tratamientos pre-germinativos sobre el la TG de semillas de <i>Lupinus</i> sp. Letras diferentes por tratamiento, son significativamente diferente ($p < 0.05$).	78
Figura 4.4. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la concentración de proteína soluble durante la germinación en semillas de <i>L. exaltatus</i> (a), <i>L. campestris</i> (b) y <i>L. montanus</i> (c)	
Testigo	82
Figura 4.6. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la concentración de azúcares solubles en semillas de <i>L. exaltatus</i>	86
Figura 4.7. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la concentración de azúcares solubles en semillas de <i>L. campestris</i> (a) y <i>L. montanus</i> (b).....	87
Figura 4.8. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la concentración de azúcares reductores ($\text{mg g}^{-1}\text{PS}$) en semillas de <i>L. exaltatus</i> (a) y <i>L. campestris</i> (b).	89
Figura 4.9. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la concentración de Azúcares Reductores ($\text{mg g}^{-1}\text{PS}$) en semillas de <i>L. montanus</i>	90
Figura 4.10. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la concentración de polifenoles totales ($\text{mg g}^{-1}\text{PS}$) en semillas de <i>L. exaltatus</i> (a) y <i>L. campestris</i> (b). Testigo: semillas sin tratamiento; PG1: H_2SO_4 15 min; PG2: H_2O 80°C 5 min; PG3: Arena húmeda 35°C 8h seguido de 16h 25° ; PG4: Arena seca 80°C 7min; PG5: Arena 150°C 1min; PG6: Arena húmeda 80°C 1min. Letras diferentes por tratamiento, son significativamente diferente ($p < 0.05$).	92
Figura 4.11. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la concentración de Polifenoles Totales ($\text{mg g}^{-1}\text{PS}$) en semillas de <i>L. montanus</i>	93
Figura 4.12. Efecto del agua 80°C 1 min sobre la concentración de Ácido absicico en semillas de <i>Lupinus</i> sp. Letras diferentes, son significativamente diferentes ($p < 0.05$). dds: días después de siembra.	94

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción general

La familia Fabaceae es una de las más grandes y de las más importantes en la economía de diferentes países, principalmente porque en algunos casos representan la única fuente de proteína en su alimentación (Duranti y Gius, 1997; Duranti, 2006). Debido a esta importancia, la Asamblea General de las Naciones Unidas proclamó a este año como “Año Internacional de la Legumbres, semilla nutritivas para un futuro sostenible” (<http://www.fao.org/pulses-2016/es/>).

Entre los géneros de ésta familia que más se cultivan para la alimentación humana y animal están *Phaseolus* sp., *Glycine max.*, *Lens culinaris*, *Pisum sativum*, *Vigna* sp., *Vicia faba*, *Cicer arietinum* y *Lupinus* sp. (Olmedilla *et al.*, 2010). Dentro del género *Lupinus* se han descrito alrededor de 275 especies (Gladstone, 1998; Hughes y Eastwood, 2006). En México, la mayor concentración taxonómica se localiza del lado del Pacífico y en el Eje Neovolcánico Transversal (Bermúdez-Torres *et al.*, 1999), y aunque existe una amplia diversidad de especies silvestres en el país, con potencial farmacológico y alimenticio (Ruiz-López *et al.*, 2006 y 2010), no se cuenta con estudios para su domesticación y manejo agronómico.

Se ha demostrado que especies del género *Lupinus* localizadas en el Eje Neovolcánico Transversal presentan altos contenidos en proteína y minerales (Güemes-Vera *et al.*, 2012; Lagunes-Espinoza *et al.*, 2012; Pablo-Pérez *et al.*, 2013), pero también de compuestos fenólicos, carbohidratos y alcaloides quinolizidínicos, los que podrían afectar la salud o reducir el riesgo de ciertas enfermedades (Jiménez-Martínez *et al.*, 2003; Ruiz-López *et al.*, 2010). Sin embargo, el aprovechamiento de este recurso se encuentra limitado porque sus semillas presentan diversos grados de latencia; y las características que la inducen son complejas.

En la familia *Fabaceae*, la latencia física obedece principalmente a una testa impermeable que rodea a los cotiledones, la cual limita la absorción de agua y el intercambio de gases (Van Ascheen *et al.*, 2003). Bajo condiciones naturales se ha observado que la latencia resulta en germinación no uniforme, que restringe el establecimiento y subsecuente

crecimiento de la planta, limitando el uso agronómico y ornamental de estas especies (Karaguzel *et al.*, 2004; Elliot *et al.*, 2011). Para la liberación de la latencia en especies del género *Lupinus*, se ha empleado el mejoramiento genético, tratamientos físicos (alternancia de temperaturas), químicos (aplicación de ácidos) y mecánicos (fractura manual de la testa) los cuales han mostrado resultados favorables (Kurlovich, 2002; Acosta-Percástegui y Rodríguez-Trejo, 2005; Zuloaga-Aguilar *et al.*, 2010; Elliot *et al.*, 2011; Pablo-Pérez *et al.*, 2013; Robles-Díaz *et al.*, 2014). La aplicación de tratamientos inductores de germinación en poblaciones silvestres de *Lupinus*, no siempre resulta en un alto porcentaje y tasa de germinación, reflejando variación intra y entre especies (Elliot *et al.*, 2011). A nivel metabólico, la aplicación de tratamientos inductores de germinación, en semillas de la familia *Poaceae* y de la familia *Juglandaceae*, producen cambios en la actividad metabólica (Shen-zou y Jia-yuan, 2007; Goggin *et al.*, 2011). Disminución en las reservas de azúcares solubles ha sido observado en semillas de la leguminosa *Erythrina velutina* (Ribeiro *et al.*, 2012). En semillas de otras especies, como *Cyclocarya paliurus*, la estratificación para promover germinación también produce cambios en los contenidos de compuestos químicos; el almidón se reduce 45%, la proteína cruda 46%, los lípidos 11%, pero los azúcares solubles se incrementan en un 101.5% (Shen-zou y Jia-yuan, 2007). Estos cambios parecen estar asociados con la liberación de la latencia.

En semillas de *Lupinus* nativos de México como *L. campestris*, *L. exaltatus* y *L. montanus* la escarificación mecánica induce 100% de germinación (Pablo-Pérez *et al.*, 2015), pero es demandante de tiempo; y la escarificación química ha demostrado que libera 100% de la latencia a semillas de *L. montanus* del Parque Nacional Cumbres, DF, México (Acosta-Percástegui y Rodríguez-Trejo, 2005). Aunque efectivo, éste último método no es sustentable para aplicarlo a lotes grandes de semillas, y difícil de sostener ecológicamente. Desde el punto de vista agronómico, el objetivo primordial sería tener una germinación homogénea de estos *Lupinus*, por lo que surgen las preguntas de investigación siguientes: ¿La aplicación de tratamientos químicos y de calor pueden romper la latencia en semillas de especies silvestres del género *Lupinus* incrementando el porcentaje y la tasa de germinación? ¿Qué cambios a nivel metabólico ocurren cuando se aplican tratamientos de liberación de latencia a estas semillas de *Lupinus* silvestres mexicanos? En base a lo anterior se plantearon los siguientes objetivos:

1.2. Objetivo general

Evaluar el efecto de cuatro regímenes de temperatura y de siete tratamientos pre-germinativos sobre la fisiología y evolución bioquímica de semillas de tres especies del género *Lupinus*.

1.2.1. Objetivos particulares

- 1 Determinar el efecto de temperatura y de tratamientos físicos y químicos sobre el porcentaje y tasa de germinación de *L. montanus*, *L. exaltatus*, *L. campestris*.
- 2 Cuantificar la evolución de proteína, aminoácidos libres, azúcares solubles totales, azúcares reductores, y polifenoles, antes y durante la germinación de semillas de las especies en estudio después de aplicar los tratamientos.
- 3 Determinar la concentración de ácido abscísico antes y después de la aplicación del tratamiento que induce mayor porcentaje de germinación en las tres especies.

1.3. Hipótesis

La respuesta en germinación de semillas de *Lupinus* es mayor cuando se aplican tratamientos físicos y químicos de escarificación, comparados con el testigo, debido a que estos debilitan la estructura de la testa permitiendo la germinación. Este proceso de liberación de latencia, es acompañado por incremento en los contenidos de proteína, carbohidratos y reducción de ABA. Durante la germinación las temperaturas frías (otoño e invierno) incrementan el porcentaje y tasa de germinación.

1.4. Literatura citada

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

Alencar, N.L.M., R.I.E. Gomes-Filho, M.I. Gallão, J.C. Alvarez-Pizarro, J. T. Prisco, and A.B. Oliveira. 2011. Seed reserve composition and mobilization during germination and early seedling establishment of *Cereus jamacaru* D.C. ssp. *jamacaru* (Cactaceae). *An. Acad. Bras. Cienc.* 84(3): 823-832.

Bermúdez-Torres, K., N. Robledo, Q., J. Martínez-Herrera, A. Tei and M. Wink. 1999. Biodiversity of the genus *Lupinus* en Mexico. En: E. van Santen, M. Wink, S. Weissmam, y P. Roemer (Ed.), *Lupin an Ancient crop for the New Millennium Proceedings of the 9th International Lupin Conference*. New Zeland: International Lupin Association.

Duranti, M. 2006. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*. 77: 67-82.

Duranti, M. and C. Gius. 1997. Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crops Research*. 53: 31-45.

Elliot, C.A., D. G. Fischer and C. J. Le Roy. 2011. Germination of three native *Lupinus* species in response to temperature. *Northwest Science*. 85(2): 403-410.

Gladstone, J. S. 1998. Distribution, origin, taxonomy, history and importance. In: J.S. Gladstone., C.A. Atkins and J. Hamblin (Eds). *Book Lupins as Crop Plants: Biology, Production and Utilization*, pp. 1-37.

Goggin, D. E., S. B. Powles, P. E. Toorop and K. J. Steadman. 2011. Dark-mediated dormancy release in stratified *Lolium rigidum* seeds is associated with higher activities of cell wall-modifying enzymes and an apparent increase in gibberellin sensitivity. *J. Plant Physiol.* 168: 527-533.

Guemes-Vera, N., J. Martínez-Herrera, J.F. Hernández-Chávez, J. Yáñez-Fernández and A. Totosaus. 2012. Comparison of chemical composition and protein digestibility, carotenoids, tanins and alkaloids content of wild *Lupinus* varieties flour. *Pakistan J. of Nutrition*. 11(8):676-682.

Hughes, C. and R. Eastwood. 2006. Island radiation on a continental scale: exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. *Royal Botanic Gardens*. 103(27): 10334-10339.

Jiménez-Martínez, C., G. Loarca-Piña and G. Dávila-Ortíz. 2003. Antimutagenic activity of phenolic compounds, oligosaccharides and quinolizidinic alkaloids from *Lupinus campestris* seeds. *Food Additives and Contaminants*. 20(10): 940–948.

Karaguzel, O., S. Cakmakci, V. Ortacesme, and B. Aydinoglu. 2004. Influence of seed coat treatments on germination and early seedling growth of *Lupinus varius* L. *Pak. J. Bot.* 36(1): 65-74.

Kurlovich B.S. 2002. Genetics of lupins. In: Kurlovich BS (ed) *Lupins: geography, classification, genetic resources and breeding*. Intan, St. Petersburg, Russia. ISBN 5-86741-034-X.

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 Bot. Mex.* 99: 73-90.

Olmedilla, A. B., R. Ferré, R., C. Asencio, V., and M. Martín, P. 2010. Role of pulses in present-day diet. *Act. Dietética*. 14(2): 72-76.

Pablo-Pérez, M., L.C. Lagunes-Espinoza, J. López-Upton, J. Ramos-Juárez y E. M. Aranda-Ibañez. 2013. Morfometría, germinación y composición mineral de semillas de *Lupinus* silvestres. *Bioagro* 25(2): 101-108.

Pablo-Pérez, M., L.C. Lagunes-Espinoza, J. López-Upton, E. M. Aranda-Ibañez y J. Ramos-Juárez. 2015. Composición química de especies silvestres del genero *Lupinus* del estado de Puebla México. Rev. Fitotecnia Mexicana. 38(1):49-55.

Ribeiro, R.C.R., B. França D., and C. R. Pelacani. 2012. Mobilization of reserves and germination of seeds of *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae – Papilionoideae) under different osmotic potentials. Revista Brasileira de Sementes. 34 (4): 580 – 588.

Robles-Díaz, E., E. Jurado, M. Ruiz-López, L. Yáñez-Espinosa, and J. Flores. 2014. Heat shock effect in breaking physical dormancy in seeds of *Lupinus elegans* and *L. rotundiflorus* from Jalisco, México. Botanical sciences. 92 (1): 123-129.

Ruiz-López, M. A., P.M. García-López, R. Rodríguez-Macías, J.F. Zamora Natera. 2010. Mexican wild lupines as a source of quinolizidine alkaloids of economic potential. Polibotánica. 29: 159-164.

Ruiz-López, M. A., R. Rodríguez- Macias y S. Navarro-Pérez. 2006. Evaluación químico-nutricional de *Lupinus axaltatus* Zucc, del Nevado de Colima, México, como fuente potencial de forraje. Interciencia. 31(10): 758-761.

Satyanarayana, B., P. Subhashinidevi, and A. Arundhati. 2011. Biochemical changes during seed germination of *Sterculia urens* Roxb. Not. Sci. Biol. 3(3): 105-108.

Shen-zuo, F. and W. Jia-yuang. 2007. Changes in biochemical composition and enzyme activity during dormancy release of *Cyclocarya paliurus* seeds. For. Stud. China. 9 (1): 7-13.

Tonguc, M., R. Elkoyunu., S. Erbas, and Y. Karakurt. 2012. Changes in reserve composition during germination and initial seedling development of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Turk J. Biol. 32: 107-112.

Van Ascheen, 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.

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. *Inter. J. of Wildland Fire*. 19: 759–773.

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia de las leguminosas

Con alrededor de 20,000 especies, las leguminosas son la tercera familia más grande de plantas superiores sobre la tierra (Gepts *et al.*, 2005). Las leguminosas se caracterizan por su fruto en forma de legumbre donde se alojan las semillas (Olmedilla *et al.*, 2010). Se clasifican en dos grupos en función de su contenido lipídico, diferenciándose así las oleaginosas como la soya y el cacahuate con niveles elevados de grasa (20-50%), de las otras leguminosas de grano como el chícharo, la lenteja, el lupino, entre otras, con un nivel inferior de grasa (7%) (Torija y Díez, 1999). El consumo de leguminosas resulta valioso como complemento en dietas a base de cereales o de tubérculos; sobre todo en regiones donde la población tiene un limitado acceso a las proteínas de origen animal (García *et al.*, 2009). Las leguminosas son cultivos importantes para la seguridad alimentaria, sobre todo de la población de América Latina, África y Asia, donde forman parte de las dietas tradicionales y a menudo son cultivadas por pequeños agricultores (SAGARPA, 2016). Dentro de las leguminosas más importantes cultivadas para la alimentación están *Phaseolus* sp., *Glycine max.*, *Lens culinaris*, *Pisum sativum* L., *Cicer arietinum*, *Vicia faba*, y *Lupinus* sp. (Olmedilla *et al.*, 2010).

De acuerdo con la FAO (2016), la producción de leguminosas a nivel mundial en el año 2013 fue de 61,155,498.28 t, siendo la India el país con mayor producción (15 millones de toneladas), seguido de Canadá y Brasil. En México, la producción de leguminosas en 2013 fue de 1,657,601.00 t (FAOSTAT, 2013). Las leguminosas, a través de la historia, siempre han sido un recurso alimenticio de gran importancia para los humanos y animales. Representan, por un lado, una fuente económica de proteínas y por otro, un suministro adicional de fibra a la dieta (García *et al.*, 2009). Sin embargo a pesar de la gran importancia que tienen las leguminosas en la seguridad alimentaria solo el 20% de estas se aprovechan como fuente de alimento (De Almeida *et al.*, 2006).

2.2. El género *Lupinus*

Lupinus es un género complejo, que pertenece al orden Fabales, la familia Fabaceae y tribu Genistae; son especies herbáceas, leñosas, anuales, bianuales o perennes. Las plantas son arbustivas caracterizadas por sus hojas palmeadas y con flores multicolores alojadas en el racimo terminal (Bermúdez-Torres *et al.*, 1999). El género se encuentra ampliamente extendido a nivel mundial con alrededor de 275 especies, que se dividen en dos grandes grupos: 12 especies del mediterráneo en el norte y el este de África y 263 especies en América del norte y del sur. Este último grupo comprende el mayor número de especies de lupinos (Figura 2.1) (Gladstone, 1998; Hughes y Eastwood, 2006). En la actualidad han sido domesticadas cinco: *L. albus* y *L. luteus* en Europa; *L. angustifolius* y *L. cosentinii* en Australia, *L. mutabilis* en Sudamérica y Europa, las cuales son utilizadas para la alimentación de humanos y animales (Gladstone, 1998; Martínez-Villaluengua *et al.*, 2006).



Figura 2.1. Distribución del género *Lupinus* en América (modificado de Hughes y Eastwood, 2006). Círculos en amarillo: especies de *Lupinus* presentes en la región andina; en rojo: especies de *Lupinus* presentes en América Central y Norteamérica y especies nativas chilenas de *L. microcarpus*; en azul: especies de *Lupinus* presentes en el noroeste de EU y en el oeste de Sudamérica

2.2.1. Distribución en México

En México se ha indicado la presencia de 111 especies de *Lupinus* en el Herbario Mexus (Bermúdez-Torres *et al.*, 1999), con una mayor concentración en el lado del Pacífico y el Eje Neovolcánico Transversal. Entre las especies identificadas donde se han realizado estudios nutricionales o ecológicos están *L. exaltatus* Zucc., *L. reflexus* Rose, *L. mexicanus* Cerv. ex lag, *L. rotundiflorus* M.E Mexus Jones, *L. elegans* Kunth., *L. simulans* Rose, *L. madrensis* Seem, *L. montanus* H.B.K, *L. stipulatus* J. Agardh. (Ruiz y Sotelo, 2001; Bermúdez-Torres, 2009; Ruiz-López *et al.*, 2010; Ferval *et al.*, 2013; Soto-Correa *et al.*, 2014; Herrera *et al.*, 2015), *L. campestris* (Jiménez-Martínez *et al.*, 2001; Rodríguez-Ambriz *et al.*, 2005), *L. aschenbornii* Schauer (Bermúdez-Torres, 2009), *L. barkeri* (Guemes-Vera *et al.*, 2012) y *L. leptophyllus* (Alderete-Chávez *et al.*, 2009). En México se les conoce con los nombres regionales de “flor de San Juan” o “flor de San Pedro”, sus flores son utilizadas para adornar fiestas religiosas y como forraje en seco para la alimentación de ovejas (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2012).

2.2.2. Producción y usos del género *Lupinus*

Australia es el mayor productor de *Lupinus* con poco más de 1, 000,000 toneladas por año, seguido de Polonia con 50,939.86 t, en tercer lugar se encuentra Chile con 40,604.41 t por año (FAOSTAT, 2014). El principal importador de semillas de *Lupinus* es la República de Corea del Sur.

Los *Lupinus* tienen una combinación única de alto contenido de proteína y fibra, buen contenido de aceites y no contienen almidón, por estos atributos de calidad de la semilla el género es considerado un recurso valioso para producción y uso en forrajes y para las nuevas industrias de alimentación. En la Unión Europea, el consumo de harinas a base de *Lupinus* como alimento es menos del 4% de la producción mundial, pero para la alimentación animal se emplea alrededor del 40% (Peterson y Wilkinson., 2015). En el sector de la salud humana, se ha encontrado que el consumo de harina de *Lupinus* puede influir benéficamente en el control glucémico, mejora los niveles de colesterol en la sangre, baja la hipertensión y mejora la salud intestinal. *L. albus* es consumido como aperitivo en el Mediterráneo, *L. angustifolius* en Australia es empleado en la elaboración de panes. La harina de *Lupinus* también es

utilizada para productos cosméticos, gracias a su aceite que es rico en una gran variedad de antioxidantes (Wolko *et al.*, 2011).

El cultivo de *Lupinus* también representa una alternativa como cultivo de rotación y una fuente de fertilización orgánica ya que puede fijar de 150-200 kg N/ha (Bhardwaj, 2002). El contenido de alcaloides en *Lupinus* silvestres es utilizado para el control biológico de *Fusarium* (Muzquiz *et al.*, 1993).

El incremento en el interés de las semillas de *Lupinus* obedece a que es una fuente de proteína vegetal para la subsistencia animal y la acuicultura, además pueden ofrecer una opción viable para la agricultura mundial en un futuro, por reducción del uso de fertilizantes químicos y para prevenir la lixiviación de nutrientes al subsuelo (Wolko *et al.*, 2011).

Aunque México es uno de los principales centros de diversificación de *Lupinus* (Bermúdez-Torres *et al.*, 1999) no hay uso y menos producción intensiva del cultivo como fuente de alimento. Las características químicas, la adaptación a diferentes altitudes y suelos ácidos de baja fertilidad, muestran una vía promisoría para el aprovechamiento sustentable de estas especies, sea para restauración ecológica o como alternativa proteica o de componentes bioactivos para la alimentación humana o animal en nuestro país (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2016).

2.2.3. Composición química

Las especies de *Lupinus* sobresalen por sus altos contenidos en proteína (28-43% dependiendo de la especie) y grasa (7.8%) y fibra (10-24%) (Jiménez-Martínez *et al.*, 2012) (Cuadro 2.1). Sin embargo, el contenido alto de alcaloides quinolizidínicos en especies silvestres parece ser la principal limitante para su aprovechamiento en alimentación (Pablo-Perez *et al.*, 2015). Actualmente, gracias a la selección y el mejoramiento genético, existen especies domesticadas (*L. albus*, *L. angustifolius*, *L. mutabilis* y *L. luteus*) con niveles bajos de alcaloides (Smýkal *et al.*, 2014). Estas especies son cultivadas principalmente en Europa para la alimentación humana y animal (Glencross, 2001; Bardwaj, 2002; Smýkal *et al.*, 2014).

Cuadro 2.1. Composición química de las semillas de *Lupinus* (% de materia seca) comparada con soya.

	<i>L. albus</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. luteus</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. montanus</i>	<i>L. campestris</i>	<i>G. max</i>
Proteína	34-42	28-34	40-46	31-40	36-42	33-48	48.7
Fibra	10.5- 14.6	13-17	12.6-18.2	24.7	21.6	16.7	22
Aceite	6-12	5-7	3.9-5.6	6.5	7.1	7.5	19.9
Ceniza	2.9-4.7	2.5-4.0	4.0-5.2	5.2	4.3	4.4	-

Adaptado de Alonso (1995); Glencross (2001); Lagunes-Espinoza *et al.* (2012); Juárez-Fuentes *et al.* (2013); Pablo-Pérez *et al.* (2015).

La fracción proteica más importante en semillas de *Lupinus* son las globulinas, las cuales tienen altos contenidos de aminoácidos tales como: arginina, lisina, leucina y fenilalanina comparadas con las de soya (*Glycine max*), pero son pobres en aminoácidos azufrados como la metionina y la cisteína (Cuadro 2.2) (Glencross, 2001).

Aminoácidos	<i>L. mutabilis</i>	<i>L. albus</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. luteus</i>	<i>Glycine max</i>
Isoleucina	4.8	4-6	3.30	2.70	4.51
Leucina	7.0	7-9	6.01	7.89	6.81
Lisina	5.9	5-6	5.60	5.35	5.66
Metionina	0.4	0.3-0.5	-	0.70	1.28
Cisteína	1.2	1-2	-	2.28	-

Adaptado de Ruiz y Sotelo (2001); Glencross (2001); Chirinos-Arias (2014).

2.3. La germinación

La semilla es un órgano de dispersión vegetal capaz de sobrevivir entre el periodo de maduración y el establecimiento de la siguiente generación de plántulas, para asegurar el ciclo de vida de las plantas superiores (Bentsink y Koornneef, 2008). Para que el proceso de germinación inicie necesita la presencia de diversos factores ambientales como temperatura, la humedad y la luz (Baskin y Baskin, 2004).

La germinación inicia con la absorción de agua por parte de la semilla (imbibición) y termina con la emergencia del eje embrionario, usualmente la radícula, a través de las estructuras que lo rodean. La germinación, en un sentido estricto, no incluye el crecimiento de las plántulas; este comienza después que la germinación ha sido completada (Bewley *et al.*, 2013). De acuerdo con Nonogaki *et al.* (2010) y Bewley *et al.* (2013) el proceso de germinación se divide en tres fases (Figura 2.2). La Fase I Imbibición: inicia con la absorción de agua por parte de la semilla, este es un proceso principalmente físico, las actividades fisiológicas pueden comenzar a los pocos minutos de que grupos de células hayan comenzado a

hidratarse, mucho antes de que todos los tejidos de la semilla estén completamente hidratados. Fase II Fase *Lag*: El potencial de absorción de agua es bajo y constante debido a la hidratación de las reservas dentro de las células, las cuales se expanden y se vuelven más activas en la conversión de almidón a azúcares y de proteínas a aminoácidos, las actividades metabólicas incrementan substancialmente con la transcripción de nuevos genes. En esta fase se da la emergencia de la radícula a través de las estructuras que la rodean (protrusión de radícula), aquí se marca el final del proceso de germinación y nos indica que la germinación ha sido completada exitosamente. En la Fase III Finalización o post-germinación: la absorción de agua es mayor debido a que las plántulas comienzan a crecer, es en este momento es donde se realiza la mayor movilización de reservas. Solo las semillas viables y con protrusión de la radícula pueden entrar a la fase III.

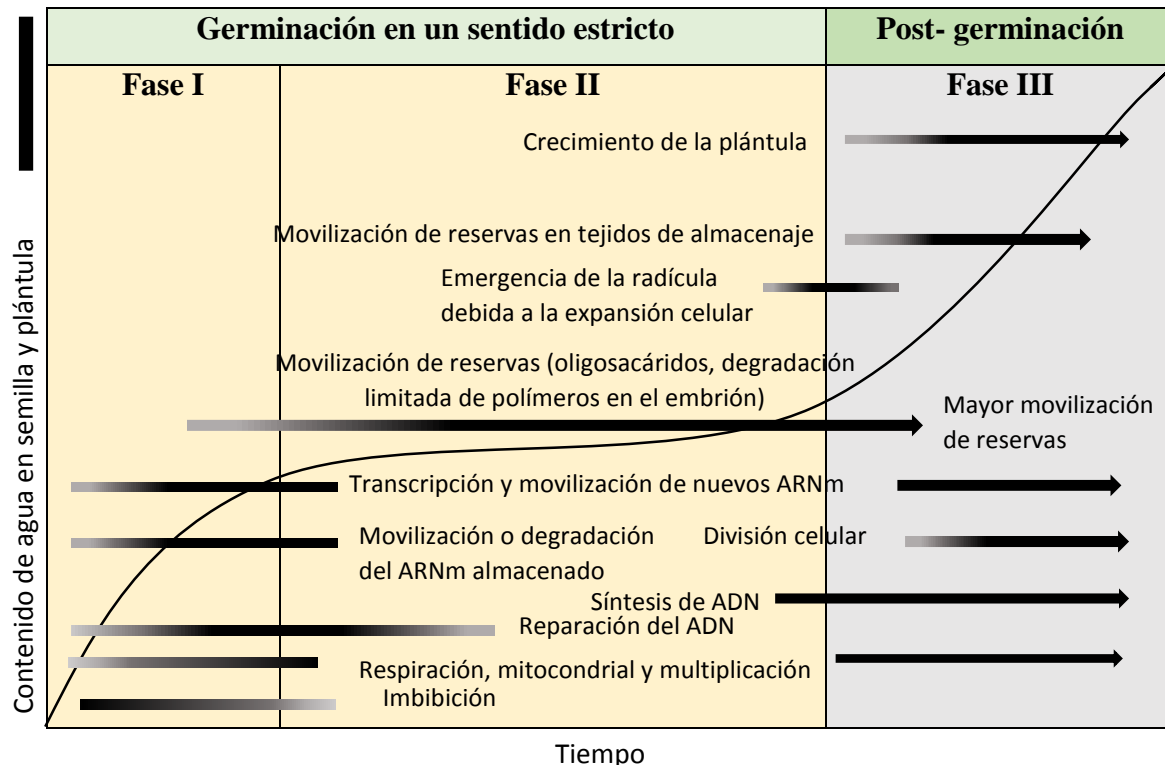


Figura 2.2. Fases del proceso de germinación de las semillas (Nonogaki *et al.*, 2010; Bewley *et al.*, 2013).

2.4. Cambios en las reservas de las semillas por efecto de la germinación

2.4.1. Proteínas

Las proteínas son polímeros de aproximadamente 20 aminoácidos diferentes, pueden estar compuestas de una o varias cadenas de péptidos de tamaños diferentes o similares. Estas cadenas pueden estar unidas por enlaces de hidrógeno relativamente débiles (no-covalentes), o por enlaces disulfuro covalentes fuertes (-S-S-) (Bewley *et al.*, 2013).

Las proteínas se dividen en cuatro clases en base a su solubilidad. Albúminas: son solubles en agua, pH neutros; Globulinas: Solubles en soluciones salinas pero insolubles en agua, además son las más abundantes en granos de leguminosas; Gluteínas: son solubles en diluciones ácidas o soluciones alcalinas; Prolaminas: solubles en soluciones de alcohol al 70-90% (Shewry *et al.*, 1995; Bewley *et al.* 2013).

Las semillas de leguminosas acumulan grandes cantidades de proteínas durante su desarrollo, la mayoría de estas proteínas carecen de cualquier actividad catabólica y no tienen un rol importante en los tejidos estructurales del cotiledón (Duranti, 2006). Son almacenadas en organelos, en la vacuola o cuerpos proteicos, en el eje embrionario y en las células del cotiledón en dicotiledóneas o bien en el endospermo y la capa de aleurona en cereales (Rosental *et al.*, 2013; Bewley, *et al.*, 2013). Las proteínas son la segunda fuente de energía más importante, en semillas de leguminosas, especialmente las proteínas de reserva, representan cerca del 20% de peso seco en frijoles y chícharos, mientras que en semillas de *Lupinus* y soya es más del 38% (Duranti, 2006). La función principal de las proteínas de almacenamiento es acumular C, N y S para ayudar en el crecimiento de las plántulas (Bewley *et al.*, 2013).

Mientras las semillas están secas, la actividad de las proteínas se encuentra en estado de reposo, pero cuando inicia el proceso de imbibición se activan durante las primeras horas (Rosental *et al.*, 2013) y son degradadas por las enzimas proteasas (Figura 2.3) (Bewley *et al.*, 2013). Además participan en una serie de actividades metabólicas básicas; a través de su degradación proveen energía para la germinación de las semillas y para el crecimiento de las plántulas y promueven la síntesis de nuevas proteínas (He *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016). Durante la germinación, los aminoácidos liberados de las proteínas de almacenamiento, por acción de las proteasas, son utilizados para síntesis de nuevas proteínas en la misma región.

En la etapa de post-germinación cuando las proteínas de reserva en el eje se han agotado, la única fuente de aminoácidos para el crecimiento de las plántulas son los cotiledones; muchos aminoácidos son utilizados para las regiones de crecimiento, otros son retenidos para la síntesis de proteasas y de otras hidrolasas requeridas para la movilización de las mayores reservas de almacenamiento (Bewley *et al.*, 2013).

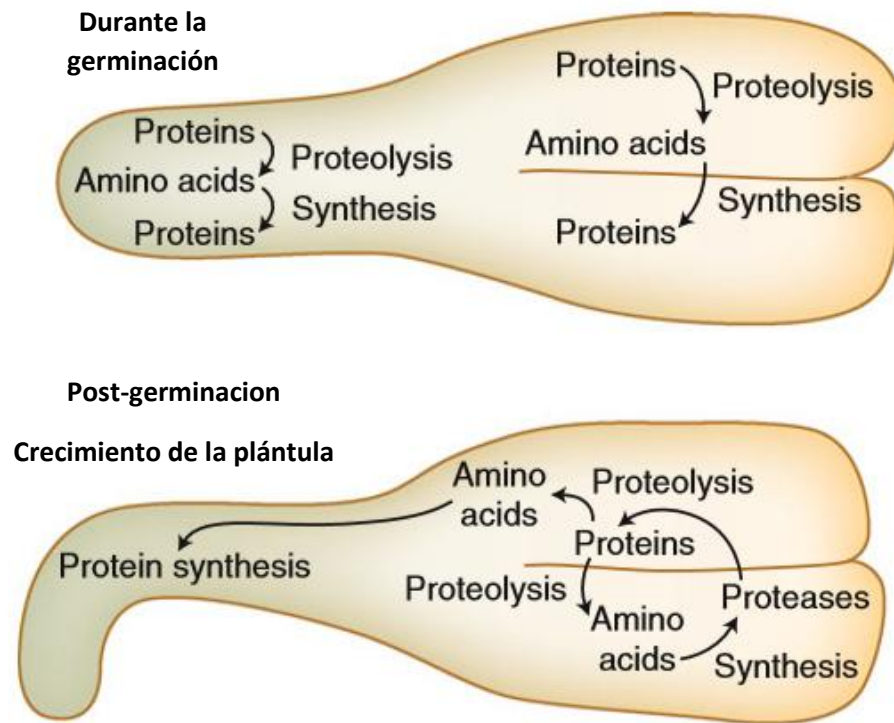


Figura 2.3. Comparación de dos patrones de movilización de proteínas almacenadas en el eje y en los cotiledones de una semilla dicotiledónea durante y después de la germinación (Bewley *et al.*, 2013).

2.4.2. Carbohidratos

Los carbohidratos son moléculas basadas en el carbono y ricas en grupos hidroxilo (-OH) (Tymoczko *et al.*, 2014), son la mayor fuente de reservas de casi todas las semillas cultivadas para la alimentación, se pueden encontrar almacenados en forma de almidón, hemicelulosas y azúcares (Bewley *et al.*, 2013). Los hidratos de carbono cumplen diversas funciones en las plantas que van desde fuentes de energía, moléculas de almacenamiento, y componentes estructurales a intermediarios en la síntesis de otras moléculas orgánicas, también actúan

como moléculas de señalamiento en células procariotas y eucariotas (Dekkers y Smeekens, 2007). El almidón es el carbohidrato más común en semillas, puede estar a través de la pared celular asociado a las hemicelulosas y algunas veces es el mayor carbohidrato de reserva, se puede encontrar en dos formas amilosa y amilopectina.

Los azúcares libres comúnmente presentes en las semillas son el disacárido sacarosa y los oligosacáridos rafinosa, estaquiosa y verbascosa, están presentes en cantidades muy variables en semillas de diferentes especies, pueden constituir del 12-16% de la materia seca en semillas de algunas leguminosas (*Lupinus* y Soya) al contrario de otras especies (cereales) donde pueden estar presentes en menos del 1% (Bewley *et al.*, 2013). Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFOs) están compuestos por unidades de galactosa, fructuosa y glucosa (Feduchi *et al.*, 2015). Se encuentran almacenados en el embrión y en los tejidos de almacenamiento en muchas especies de monocotiledóneas, dicotiledóneas y angiospermas. Los RFOs son de gran interés con respecto a la nutrición humana y animal por que no son digeridos o absorbidos en el tracto intestinal, son degradados por la flora del colón, produciendo H₂ y CO₂ lo que provoca flatulencias (Bewley *et al.*, 2013; Feduchi *et al.*, 2015).

En el transcurso de la maduración de las semillas los compuestos de reservas, tales como azúcares y proteínas, se acumulan antes de la deshidratación y contribuyen a proteger al embrión del deterioro debido a la pérdida del agua, esto ha sido observado en semillas de *Pisum sativum* L. (Pérez-Camacho *et al.*, 2008). Durante la germinación, los azúcares almacenados en las semillas son consumidos por la demanda de energía de este proceso (Bewley *et al.*, 2013). Otra de las funciones principales de los azúcares es regular la concentración y la respuesta al ABA. En las primeras etapas de post-germinación se inicia la degradación de las unidades de glucosa a través de la enzima α -galactosidasa y también inicia la hidrólisis de la sacarosa por la enzima invertasa para sostener el crecimiento de las plántulas (Bewley *et al.*, 2013). En semillas de *Arabidopsis*, la adición de glucosa retrasa la germinación al afectar la expresión de genes involucrados en la misma, las actividades de sus productos y el crecimiento de las plántulas (Prince *et al.*, 2003). La aplicación de tratamientos de secado (temperatura) a semillas de *Lycopersicon esculentum* Mill no afecta la concentración de monosacáridos (glucosa y fructuosa) (Pérez-Camacho *et al.*, 2008).

2.4.3. Aminoácidos

Los aminoácidos son sustancias orgánicas y son los constituyentes de las proteínas (Wu, 2009). Un α -aminoácido consta de un átomo de carbono central, denominado *carbono α* , unido a un grupo amino, a un grupo ácido carboxilo, a un átomo de hidrógeno y a una cadena lateral denominada grupo R. Cada tipo de aminoácido contiene un grupo R distinto (Figura 2.4) (Tymoczko *et al.*, 2014).

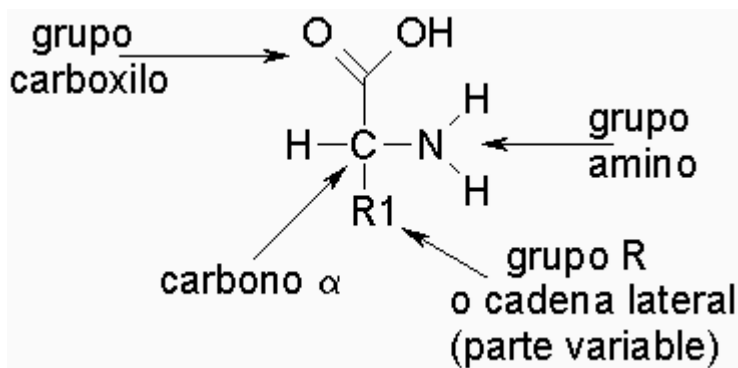


Figura 2.4. Estructura de un aminoácido (Tymoczko *et al.*, 2014).

En la naturaleza existen 20 aminoácidos y se les puede clasificar como esenciales (valina, leucina, treonina, lisina, triptófano, histidina, fenilalanina, isoleucina, arginina y metionina) y no esenciales (alanina, prolina, glicina, serina, cisteína, aspargina, glutamina, tirosina, ácido aspártico y ácido glutámico) (Feduchi *et al.*, 2015). Los humanos y animales son incapaces de sintetizar aminoácidos esenciales, por lo tanto es necesario obtener estos aminoácidos de las proteínas de plantas especialmente de las semillas (Ufaz y Galili, 2008). Sin embargo las proteínas de las semillas de leguminosas contienen niveles bajos de aminoácidos azufrados como la metionina, cisteína y triptófano, pero son ricas en lisina, un aminoácido esencial, en comparación con las de cereales (Duranti, 2006).

Durante la germinación, los aminoácidos libres son utilizados para la síntesis de nuevas proteínas pero no se encuentran en concentraciones suficientes para sostener la nueva síntesis, el incremento en la concentración de aminoácidos se puede observar hasta el momento en que la radícula emerge y se inicia la re movilización de las proteínas al nuevo sitio de almacenamiento (Bewley *et al.*, 2013).

2.4.4. Ácido absícico (ABA)

Las fitohormonas son compuestos químicos que están involucrados en la regulación del crecimiento y el desarrollo de las plantas, están agrupadas de acuerdo a sus funciones, en seis clases: Giberelinas, Auxinas, Citoquininas, Etileno, ABA y los Brasinoesteroides (Bewley *et al.*, 2013). El ABA (Figura 2.5) y las giberelinas son dos hormonas muy importantes en la germinación y deben estar en balance de síntesis y catabolismo ya que de ellas depende la transición del estado quiescente (estado de reposo) a la germinación de las semillas, lo cual representa un estado crítico en el ciclo de vida de las plantas (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009). El ABA es un compuesto isoprenoide formado por la unión de precursores de carotenoides, sirve como un señalador específico de la planta durante el desarrollo, en respuesta a estrés por frío, la sequía y altas concentraciones de salinidad en el suelo. En semillas está involucrado en la promoción de la síntesis de proteínas, en la tolerancia a la desecación e inducción y mantenimiento del estado quiescente (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009, Bewley *et al.*, 2013). El ABA mantiene el estado quiescente en semillas de cereales por medio de la inhibición de la actividad de enzimas (proteinasas, lipidasas y fitinasas) que son activadas en la capa de aleurona (Rosental *et al.*, 2014). Una de las principales funciones del ABA para inhibir la germinación es controlar la absorción de agua de los tejidos embrionarios metabólicamente activos (Schopfer *et al.*, 1979). En semillas de *Pseudotsuga menziessi* se ha observado que la capacidad de respuesta a la síntesis de ABA durante la germinación pudiera estar afectada por cambios en la temperatura o por alteraciones en la vía de transducción afectando su percepción (Corbineau *et al.*, 2002). Un efecto similar se ha observado en semillas de *Arabidopsis*, en donde las altas temperaturas estimulan la biosíntesis de ABA y suprimen la biosíntesis de las giberelinas (Toh *et al.*, 2008). En semillas de *Oriza sativa*, el gen adyacente *qSD12* promueve la acumulación de ABA en las primeras etapas de desarrollo y posteriormente es utilizado para inducir latencia primaria que es caracterizada por el retraso de la germinación o una tasa baja de germinación (Xing-You *et al.*, 2010).

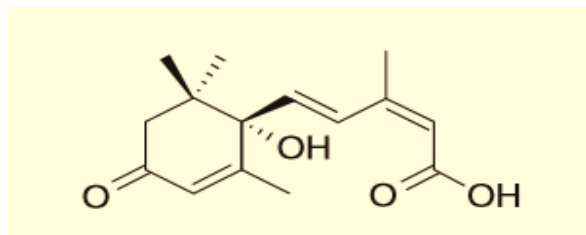


Figura 2.5. Estructura Molecular del Ácido absísico (Bewley *et al.*, 2013)

2.4.5. Polifenoles

Los polifenoles son compuestos provenientes del metabolismo secundario de las plantas y se encuentran naturalmente en alimentos y bebidas de origen vegetal, se caracterizan por la presencia de uno o más anillos tipo benceno (Dueñas *et al.*, 2009). Aunque los metabolitos secundarios no tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la vida de las plantas son muy importantes para la adaptación al medio ambiente y para la defensa contra patógenos y herbívoros (Ramakrishna y Ravishankar, 2011). Los mayores componentes polifenólicos de las leguminosas son taninos, fenoles ácidos y flavonoides. En leguminosas, los polifenoles intervienen en el proceso de germinación debido a que la oxidación de los flavonoides puede influir de manera muy importante no sólo en la limitación de absorción del agua, sino también en restringir el suministro de oxígeno al embrión (Debeaujuon *et al.*, 2000). En semillas de *Lupinus angustifolius* L. se observó que durante la germinación ocurren cambios significativos en la concentración de fenoles (Dueñas *et al.*, 2009), ocasionado principalmente por la activación de enzimas esterasas endógenas las cuales liberan los compuestos fenólicos unidos a la pared celular y a la síntesis de nuevos compuestos fenólicos (Dueñas *et al.*, 2009; Carciochi *et al.*, 2014). También en semillas de cereales se ha observado que la concentración de compuestos fenólicos se incrementa durante la germinación por la activación de enzimas que degradan las paredes celulares y modifican la estructura de estas (Sharma *et al.*, 2015). El estrés por calor o frío también influyen en la producción de metabolitos secundarios en plantas (Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

2.5. Concepto de latencia y clasificación

La latencia es la incapacidad de una semilla madura y sana para germinar en un tiempo dado, aun cuando las condiciones ambientales sean favorables para la germinación (Baskin y Baskin, 2004; Tung y Serrano, 2011). Es también un mecanismo que adopta la semilla para superar condiciones de estrés o para sobrevivir. La latencia se puede clasificar en cinco clases de acuerdo a Baskin y Baskin (2004):

Latencia física: es causada por una o más capas de células de empalizada en la testa de las semillas las cuales son impermeables al agua. Para romper esta latencia se ha empleado la escarificación con tratamientos físicos y químicos y de esta manera promover la germinación. La latencia física se encuentra en al menos 17 familias de plantas que son de importancia agronómica, como la Fabaceae, Malvaceae, Cannaceae, Geraniaceae y Convolvuceae. En el caso de las fabáceas, la latencia física es impuesta por la testa dura, la cual tiene un papel importante en el desarrollo de las semillas, debido a que no solo provee estructura y protección a la semilla, sino que también es muy importante en la germinación por la regulación de la absorción de agua (Smýkal *et al.*, 2014).

Latencia morfológica: en semillas con latencia morfológica el embrión es pequeño y no está diferenciado, los embriones de estas semillas no son fisiológicamente latentes y no requieren tratamientos previos solo necesitan mayor tiempo de germinación.

Latencia fisiológica: Este tipo de latencia es dada por la baja permeabilidad de las cubiertas a los gases en conjunción con bloqueos metabólicos con distinta profundidad. En este caso para promover la germinación se requiere generalmente estratificación (tratamientos de frío).

Latencia morfo-fisiológica: Este tipo de latencia es debida a que los embriones no están completamente desarrollados, además se combina con latencia fisiológica. Para que se pueda promover la germinación se requiere la aplicación de tratamientos pre-germinativos (físicos, químicos, mecánicos, estratificación) y tiempo.

La intensidad de la latencia dentro de una especie puede variar entre poblaciones, dentro de una población y entre semillas colectadas en años diferentes de una misma población. También se ha observado heterogeneidad en latencia entre semillas a nivel de planta individual, dependiendo de la edad y el estado nutricional de la planta madre durante la maduración de la semilla, posición en la planta, tamaño y forma, el tiempo durante la cosecha y la duración del almacenamiento (Smýkal *et al.*, 2014). Las semillas que no presentan

latencia y no germinan es debido a la ausencia de uno o más factores que inducen la germinación como son la luz, la humedad, el oxígeno, se dice que estas semillas están en estado quiescente (Baskin y Baskin, 2004).

2.6. Latencia y sus implicaciones en germinación y desarrollo de cultivos

La latencia física puede ser un problema para los productores de semillas, pero también puede ser una ventaja para conservar la calidad de semillas, para la protección del embrión contra daños mecánicos, enfermedades y plagas. En especies de interés agrícola es indeseable la presencia de una testa dura, que conlleva a una latencia física, ya que contribuye a que la germinación no sea homogénea disminuyendo los rendimientos y la calidad de la cosecha (De Sousa y Filho, 2001; Zuluaga-Aguilar *et al.*, 2010; Tung y Serrano, 2011).

La latencia no solo impide la germinación inmediata, sino que también regula el tiempo, las condiciones y la ubicación donde se producirá la germinación, también influye en la dinámica poblacional en ecosistemas naturales (Smykal *et al.*, 2014). Dentro de estos ecosistemas las especies que presentan latencia física, algunas se pueden regenerar de manera natural después de un incendio ya que el fuego contribuye a la fragmentación de la testa, y tiene efectos ecológicos en las comunidades vegetales, la regeneración y la sustitución de poblaciones de plantas, mediante la estimulación de la germinación y la brotación vegetativa (Zuluaga-Aguilar *et al.*, 2010). En especies silvestres, las semillas con testa dura son de gran importancia, ya que esta característica permite regular la germinación y la conservación de bancos de semillas, pero también contribuye a la acumulación de bancos de semillas de arvenses en zonas agrícolas, lo que ocasiona la permanencia de este problema aun después de haber eliminado a las plantas maduras (De Sousa y Filho, 2001).

2.7. Latencia en el género *Lupinus*

Las condiciones que inducen la germinación en semillas de testa dura de plantas del género *Lupinus* pueden ser complejas. Como se mencionó en el inciso 2.5, la latencia física esta impuesta por una testa dura que no permite la absorción de agua, esto dificulta la germinación después de siembra. Sin embargo existen métodos que han sido probados para

promover la germinación como son el choque de calor y la alternancia de temperaturas, aunque se ha observado variación intraespecífica en la germinación resultante (Elliot *et al.*, 2011). En estudios realizados en semillas de *L. varius* y *L. montanus* se ha demostrado que el rompimiento de la testa por métodos de escarificación mecánica ó química, resulta en un incremento considerable del porcentaje de germinación mayor al 90 %, sin embargo aunque estos métodos son muy efectivos, el método químico podría dañar el embrión y en consecuencia reducir la viabilidad de la semilla, además ambos (mecánicos o químicos) no son prácticos para el manejo de volúmenes grandes de semilla. En tratamientos con escarificación química se ha empleado el nitrógeno líquido, pero éste no ha mostrado efecto sobre la germinación en lupino blanco (Tiryaki y Topu, 2014).

Otra alternativa, es el empleo de ácido sulfúrico para escarificar que ha demostrado un incremento en el porcentaje de germinación de 50 a 100%, pero es un método que implica riesgos de lesiones durante el manejo y altos costos (Karaguzel *et al.*, 2004; Hernández-Ferretiz *et al.*, 2008; Gutiérrez-Nava *et al.*, 2010).

Se ha sugerido que los tratamientos térmicos, como cambios bruscos de temperatura provocan grietas en la testa de la semilla, debido a que la células que la conforman sufren una expansión en el agua caliente y posterior contracción por efecto de la disminución de la temperatura (Tiryaki y Topu, 2014).

2.7.1. Métodos para debilitar la testa en semillas de *Lupinus*

Existen muchos métodos para la liberación de latencia física en semillas, como los mecánicos, físicos y químicos para remover la testa, cuyo proceso es llamado escarificación (Baskin y Baskin, 2004).

En semillas de *Lupinus* se han empleado los tratamientos que se muestran en el Cuadro 2.3, sin embargo la respuesta a germinación de los tratamientos varía entre especies (Elliot *et al.*, 2011) y aún dentro de una misma especie.

Cuadro 2.3. Tratamientos físicos y químicos aplicados a semillas del género *Lupinus* sp.

Método y Tratamiento	Especie	Germinación obtenida (%)	Referencia
• Exposición de semillas a altas temperaturas, 120°C.	<i>L. exaltatus</i>	40	Zuluaga-Aguilar <i>et al.</i> , 2010.
• Inmersión de semillas en agua hirviendo 10min.	<i>L. varius</i>	80	Karaguzel <i>et al.</i> , 2004.
• Inmersión en H ₂ SO ₄ 12 h.	<i>L. varius</i>	86.7	Karaguzel <i>et al.</i> , 2004.
• Inmersión en H ₂ SO ₄ 1 h seguido de inmersión en AG ₃ 24 h.	<i>L. diffusus</i>	30	Dehgan <i>et al.</i> , 2003.
• Inmersión en H ₂ SO ₄ 90 min.	<i>L. campestris</i>	50	Gutiérrez-Nava <i>et al.</i> , 2010.
• Inmersión en H ₂ SO ₄ 15 min.	<i>L. montanus</i>	75	Hernández-Ferretiz <i>et al.</i> , 2008.
• Inmersión en H ₂ SO ₄ 40 min.	<i>L. bilineatus</i>	82	Acosta-Percástegui y Rodríguez-Trejo, 2005 Martínez <i>et al.</i> , 2008.
• Escarificación con fuego		39	
• Escarificación mecánica	<i>L. campestris</i>	55	Pablo-Pérez <i>et al.</i> , 2013.
	<i>L. montanus</i>	48	
	<i>L. exaltatus</i>	91.6	
• Exposición de semillas a 150°C 1 min.	<i>L. exaltatus</i>	81.0	Zuloaga-Aguilar <i>et al.</i> , 2011.
• 2 sem. a 5°C seguidas de fluctuaciones de temperatura a 15-7°C	<i>L. polyphyllus</i>	70.0	Elliot <i>et al.</i> , 2011
• Calor seco a 80°C	<i>L. lepidus</i>	12	Elliot <i>et al.</i> , 2011
• Agua a 80°C		55	

2.8. Literatura citada

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

Alderete-Chávez, A., V. Espinosa-Hernández, N. de la Cruz- Landero, E. Ojeda-Trejo and H. Brito-Vega. 2009. Evaluation of two *Lupinus* species native from central Mexico in relation with solubilization of Nitrogen, Phosphorus and Potassium in an Andosol. *Journal of Applied Sciences*. 8: 1583-1587.

Alonso, J. L. J. 1995. El empleo del altramuz en la alimentación animal. *Agricultura: Revista agropecuaria*. 751:137-139.

Baskin, J. M. and C. C. Baskin. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14(1): 1-16.

Bentsink L. and M. Koornneef. 2008. Seed Dormancy and Germination. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*. 6:e0119. doi:10.1199/tab.0119.

Bermúdez-Torres, K., J. Martínez-Herrera, R. Figueroa-Brito, M. Wink and L. Legal. 2009. Activity of quinolizidine alkaloids from three mexican *Lupinus* against the lepidopteran crop pest *Spodoptera frugiperda*. *BiolControl*. 54: 459-466.

Bermúdez-Torres, K., N. Robledo Q., J. Martínez-Herrera, A. Tei and M. Wink. 1999. Biodiversity of the genus *Lupinus* en México. En E: van Santen, M. Wink, S. Weissmam, y P. Roemer (Ed.), *Lupin an Ancient crop for the New Millenium Proceedings of the 9th International Lupin Conference*. New Zeland: International Lupin Association.

Bewley, J. D., K. J. Bradford, H. W. M. Hilhorst, and H. Nonogaki. 2013. *Seeds: Physiology and Dormancy*. 3rd edition. Springer New York. 392 pp.

Bhardwaj, L.H. 2002. Evaluation of *Lupin* as a new food/feed crop in the US Mid-Atlantic Region. Journal Article Series. 227: 115-119.

Carciochi, R.A., Manrique, G.D. and Dimitrov, K. 2014. Changes in phenolic composition and antioxidant activity during germination of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) International Food Research Journal. 21 (2): 767-773.

Chirinos-Arias, M.C. 2014. Andean Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) a plant with nutraceutical and medicinal potential. Revista Bio Ciencias. 3(3): 163-172.

Corbineau, F., J. Bianco, G. Garelo, and D. Come. 2002. Breakage of *Pseudotsuga Menziessi* seed dormancy by cold treatment as related to changes in seed ABA sensitivity and ABA levels. Physiologia Plantarum. 114: 313-319.

De Almeida, G.E., K.D. Queiroz, M., S.M. Manchado and A. Costa. 2006. Chemical composition, dietary fiber and resistant starch contents of raw cooked pea, common bean, chickpea and lentil Legumes. Food Chemistry .94:327-330.

De Souza, D.H.F. and J. Marcos-Filho. 2001. The seed coat as a modulator of seed environment relationship in Fabaceae. Revta Brasil. Bot., Sao Paulo. 24(4):365-375.

Debeaujon, I., K. M. Leon-Kloosterziel, and M. Koornneef. 2000. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. Plant Physiology. 22: 403-4013.

Dehgan B., J.G. Norcini, S.M. Kabat and H.E. Pérez. 2003. Effect of seed scarification and gibberellic acid treatment on seedling emergence of Sky-Blue Lupine (*Lupinus diffusus*). J. of Environmental Horticulture. 21: 64-67.

Dekkers, B. J.W. and Smeekens, S. C.M. 2007. Sugar and abscisic acid regulation of germination and transition to seedling growth. In: Seed Development, Dormancy and

Germination (eds K. J. Bradford and H. Nonogaki), Annual Plant Reviews Volume 27, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.

Dueñas, M., T. Hernández, I. Estrella, and D. Fernández. 2009. Germination as process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). Food Chemistry. 117: 599-607.

Duranti, M. 2006. Grain legume proteins and nutraceutical properties. Fitoterapia. 77: 67-82.

Elliot, C.A., D. G. Fischer and C. J. Le Roy. 2011. Germination of three native *Lupinus* species in response to temperature. Northwest Sci. 85(2): 403-410.

FAO, 2016. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/pulses-2016/es/>. Consultado Mayo 2016.

FAOSTAT. 2013. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Dirección de Estadística. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>. Consultado Mayo 2016.

FAOSTAT. 2014. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/statistics/es/>. Consultado Mayo 2016.

Feduchi, C. E., C. Romero M., E. Yañez C., I. Blasco C., C. Garcia-Hoz J. 2015. Bioquímica conceptos esenciales. 2a. ed. Editorial Médica Panamericana. 456 pp.

Ferval, M., L. Legal, C. Gers, C. Pelissier, P. Winterton, J.A. Sánchez-López, M.L. Corona-Rangel and K. Bermúdez-Torres. 2013. When island-like populations at high elevation show genetic divergence despite no morphological variability: the case of *Lupinus montanus* in Central Mexico. Turk J. Bot. 37: 789-801.

García, O. O. E., R. B. Infante R., C. J. Rivera. 2009. Las leguminosas, una fuente de fibra alimentaria: Una visión en Venezuela. Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". 40(1): 57-63.

Gepts, P., W. D. Beavis, E. C. Brummer, R. C. Shoemaker, H. T. Stalker, N.F. Weeden, and N. D. Young. 2005. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. Plant Physiology. 137: 1228-1235.

Gladstone, J. S. 1998. Distribution, origin taxonomy, history and importance. In: J. S. Gladstone., C. A. Atkins and J. Hamblin (Eds). Book *Lupins* as Crop Plants: Biology, Production and Utilization 1-37.

Glencross, B. D. 2001. Feeding lupins to fish: A review of the nutritional and biological value of lupins in aquaculture feeds. The Department of Fisheries, Government of Western Australia (DFWA).

Guemes-Vera, N., R. J. Peña-Bautista, C. Jiménez-Martínez, G. Dávila-Ortiz, and G. Calderón-Domínguez. 2008. Effective detoxification and decoloration of *Lupinus mutabilis* seeds derivatives, and effect of these derivatives on bread quality and acceptance. Science of Food and Agriculture. 88: 1135-1143.

Gutiérrez-Nava. P., F. De León, G., J. Etchevers, B., and A. Casas F. 2010. Effect of scarification, self-inhibition, and sowing depth on seed germination of *Lupinus campestris*. Chil. J. Agric. Res. 70(3): 365-371.

He, M., C. Zhu, K. Dong, T. Zhang, Z. Cheng, J. Li, and Y. Yueming. 2015. Comparative proteome analysis of embryo and endosperm reveals central differential expression proteins involved in wheat seed germination. BMC Plant Biology. 15: 97.

Hernández-Ferretiz, E., R. K. Rivera M., O. J. Ramos H., F. C. Salinas P., M. Rodríguez M., and K. Bermúdez T. 2008. Influence of seed coat treatments on germination and early seedling growth of *Lupinus varius* L. *Pak. J. Bot.* 36(1): 65-74.

Herrera, V. 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(5): 337-342.

Hughes, C. and R. Eastwood. 2006. Island radiation on a continental scale: Exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. *PNAS* 103(27): 10334-10339.

Jiménez- Martínez, C., A. Cardador-Martínez, A.L. Martínez-Ayala, M. Muzquiz, M. Martín-Pedrosa, and G. Dávila-Ortiz. 2012. Changes in protein, non nutritional factors, and antioxidant capacity during germination of *L. campestris* seed. *International Journal of agronomy.* ID 387407, 7 pages.

Jiménez-Martínez, C., H. Hernández, S., G. Álvarez, M., N. Robledo-Quintos, J. Martínez-Herrera and G. Dávila-Ortiz. 2001. Effect of aqueous and alkaline thermal treatments on chemical composition and oligosaccharide, alkaloid and tannin contents of *Lupinus campestris* seeds. *J. of Science of Food and Agriculture.* 81: 421-428.

Jiménez-Martínez, G. Laorca-Piña and G. Dávila-Ortiz. 2003. Antimutagenic activity of phenolic compounds, oligosaccharides and quinolizidinic alkaloids from *Lupinus campestris* seeds. *Food Additives and Contaminants.* 20(10): 940-948.

Juarez-Fuentes, B. 2013. Cambios bioquímicos en semillas de *Lupinus montanus* y *L. exaltatus* asociados a tratamientos físicos, químicos y germinativos. Tesis de Maestría en Ciencias. Posgrado en Producción Agroalimentaria en el Trópico. Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. 121págs.

Karaguzel, O., S. Cakmakci, V. Ortacesme, and B. Aydinoglu. 2004. Influence of seed coat treatments on germination and early seedling growth of *Lupinus varius* L. Pak. J. Bot. 36(1): 65-74.

Lagunes-Espinoza, L. C. 2016. Mexican Lupines, legumes with a nutritional and pharmacological potential neglected. Journal of Botanical Sciences. 4(3): 71-72

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 region Centro-oriental del estado de Puebla, México. Acta Botanica Mexicana. 99: 73-90.

Liu, S.J., H. H. Xu, W.Q. Xu, W. Q. Wang, N. Li, W.P. Wang, Z. Lu, I. M. Moller, and S. Q. Song. 2016. Identification of embryo proteins associated with seed germination and seedling establishment in germination rice seeds. Plant Physiology. 196-197: 79-92.

Martínez, J.M., D.A. Rodríguez-Trejo, E. Guizar-Nolazco, and R. Bonilla-Beas. 2008. Natural and artificial scarification of *Lupinus bilineatus* Benth. seeds. Rev Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 14(4): 73-79.

Martínez-Villaluenga, C., J. Frias, and C. Vidal-Valverde. 2006. Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars. Food Chemistry. 91:645-649.

Muzquiz, H., C. Burbano, C. Cuadrado, and C. de la Cuadra. 1993. Determination of thermoresistant antinutritional factors in legumes. I. Alkaloids. Invest. Agrar. : Prod. Prot. Veg. 8: 351-361.

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

Olmedilla, A.B., R. Ferré, R., C. Asensio, V. and M. Martín, P. 2010. Role of pulses in present-day diet. *Actividad Dietetica*. 14(2): 72-76.

Pablo-Pérez, M., L.C. Lagunes-Espinoza, J. López-Upton, E. M. Aranda-Ibañez y J. Ramos-Juárez. 2015. Composición química de especies silvestres del género *Lupinus* del estado de Puebla México. *Rev. Fitotecnia Mexicana*. 38(1): 49-55.

Pérez-Camacho, I., V.A. González-Hernández, J. C. Molina-Moreno, O.J. Ayala-Garay, and A. Peña-Lomeli. 2008. Germination, vigor and sugar content in response to development and desiccation of *Physalis ixocarapa* Brot. seeds. *Interciencia*. 33(10): 762-766.

Peterson, J. and I. Wilkinson. 2015. Western Australian lupin industry. Department of Agriculture and Food. www.agric.wa.gov.au (Consulta: Mayo 2016).

Prince, J., T. C. Li, S. G. Kang, J. K. Na, and J. C. Jang. 2003. Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 132: 1424-1348.

Ramakrishna, A., and G. A. Ravishankar. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 6: 1720-1731.

Rodríguez-Ambriz, S., L. A. L. Martínez-Ayala, F. Millán and G. Dávila-Ortiz. 2005. Composition and functional properties of *Lupinus campestris* protein isolates. *Plant Foods for Human Nutrition*. 60: 99-107.

Rodríguez-Gacio, M. C., M. A. Matilla-Vazquez, and A. J. Matilla. 2009. Seed dormancy and ABA signaling. The Breakthrough goes on. *Plant signaling & Behavior* 4 (11): 1035-1048.

Rosental, L., H. Nonogaki, and A. Fait. 2014. Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research*. 24: 1-15.

Ruíz, M. A. and A. Sotelo. 2001. Chemical composition, nutritive value, and toxicology evaluation of Mexican wild lupin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 5336-5339.

Ruíz-López, M. A., P. M. García-López, R. Rodríguez-Macías, and J. F. Zamora Natera. 2010. Mexican wild lupines as a source of quinolizidine alkaloids of economic potential. *Polibotánica*. 29: 159-164.

Schopfer, P., D. Barjracharya, and C. Planchy. 1979. Control of seed germination by abscisic acid. *Plant Physiol*. 64: 822-827.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2016. <http://www.gob.mx/sagarpa/articulos/legumbre-o-leguminosa>. Consultado 22 de Mayo.

Sharma, S., D. C. Saxena, and C. S. Riar. 2015. Analysing the effect of germination on phenolics, dietary fibres, minerals and γ - amino butiryc acid contents of barnyard millet (*Echionochla frumentacea*). *Food Bioscience*. 13: 60-68.

Shewry, R. P., A. J. Napier, and S. A. Tatham. 1995. Seed storage proteins: structure and biosíntesis. *The Plant Cell*. 7: 945-946.

Smykal, P., V. Vernoud, M. W. Blair, A. Soukup, and R. D. Thompson. 2014. The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science* 5(351): 1-19.

Soto-Correa, J. C., R. Linding-Cisneros, and C. Saenz-Romero. 2014. *Lupinus elegans* Kunth assisted migration in common garden field tests. *Rev. Fitotec. Mex.* 37(2): 107-116.

Tiryaki, I. and M. Topu. 2014. A novel method to overcome coat-imposed seed dormancy in *Lupinus albus* L. and *Trifolium pratense* L. 2014. *Journal of Botany*. Article ID 647469, 6 p.

Toh, S., A. Imamura, A. Watanabe, K. Nakabayashi, M. Okamoto, Y. Jikumaru, A Hanada, Y Aso, K Ishiyama, N. Tamura, S. Luchi, M. Kobayashi, S. Yamaguch I., Y Kamiya, E. Nambara, and N. Kawakam. 2008. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol.* 146: 1368-1385.

Torija, M.E. y C. Diéz, 1999. Legumbres. En: tratado de nutrición, Hernández, M., Sastre, A. (Ed.), Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España. pp: 425-429.

Tung, L. D., and E. P. Serrano. 2011. Effects of warm water in breaking dormancy of rice seed. *Omonrice.* 18: 129-136.

Tymoczko, L. J., J. M. Berg, y L. Stryer. 2014. Bioquímica curso básico. Segunda edición en español. Barcelona. Editorial Reverte. 727 pp.

Ufaz, S. and G. Galili. 2008. Improving the content of essential amino acid in crop plants: Goals and opportunities. *Plant Physiology.* 147: 854-961.

Wolko, B., C. Clements, J., B. Naganowska, N. Nelson M. and H. Yang. 2011. Wild crop relatives: Genomics and Breeding Resources, *Legume Crops and Forages.* Strzesznska 34: 60-479.

Wu, G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids.* 37: 1-7.
DOI: 10.1007/s00726-009-0269-0.

Xing-You, G., T. Liu, J. Feng, J. C. Suttle, J. Gibbons. 2010. The qSD12 underlying gene promotes abscisic acid accumulation in early developing seeds to induce primary dormancy in rice. *Plant Mol. Biol.* 73: 97-104.

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 México. *International Journal of Wildland Fire*. 19 (6): 759-773.

CAPITULO III

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL PORCENTAJE, TASA DE GERMINACIÓN Y BIOQUÍMICA DE SEMILLAS DE *Lupinus* spp.

3.1. Introducción

Las leguminosas son una familia amplia, a nivel mundial existen 725 géneros y 19,327 especies (Lewis *et al.*, 2005). En la alimentación humana y animal son utilizadas hasta 150 especies de leguminosas debido a que sus semillas son una buena fuente de proteína con rangos que van de 20-30% en frijol y de un 38-40% en soya y lupino. Presentan también lípidos con contenidos bajos a altos (7% para chícharo, lenteja, lupino y 20-50% para cacahuete y soya), y fibra dietética (Olmedilla *et al.*, 2010). Sin embargo el establecimiento de cultivos de la mayoría de la fabáceas está limitado por la latencia física que presentan sus semillas, asociada principalmente a la dureza de la testa, la cual no solo le provee estructura y protección, sino que también es muy importante para la germinación por la regulación de la absorción de agua (Smýkal *et al.*, 2014). Existen diferentes factores que pueden influir en la ruptura de la latencia y entre ellos se encuentra la temperatura (Hazebroek y Metzger, 1990), ya que después del agua, la temperatura es el factor más importante que puede determinar la germinación (Bewley *et al.*, 2013).

Se ha encontrado que la alternancia de temperaturas que simulan las condiciones ambientales de germinación *in situ* de las semillas, promueven la germinación de semillas de *Lupinus* con latencia física (Elliot *et al.*, 2011). En semillas de la leguminosa *E. contortisiliquum*, temperaturas menores a 18.2°C y máximas de 38.8°C disminuyen el porcentaje de germinación (De Lima *et al.*, 1997). En *Lupinus bilineatus* una alternancia de temperaturas de 15/10°C favoreció el porcentaje de germinación (42%) en comparación con las temperaturas de 30/25°C (29%) (Martínez *et al.*, 2008). Semillas de *Lupinus polyphyllus*, *Lupinus lepidus* y *Lupinus albicaulis* fueron afectadas significativamente por la aplicación de regímenes de temperaturas, pero la respuesta a la temperatura fue diferente entre especies. Esto sugiere que existe variación intraespecífica entre especies en respuesta a la temperatura de germinación (Elliot *et al.*, 2011).

La liberación de latencia física por efecto de temperatura conlleva la reactivación metabólica interna de la semilla al permitir la entrada de agua a través de la testa. Durante el proceso de germinación, se realiza la síntesis y re movilización de proteínas, oligosacáridos de la familia

de la sacarosa y la rafinosa (RFO) y otros compuestos (Nonogaki *et al.*, 2010; Bewley *et al.*, 2013). La hidrólisis de oligosacáridos y otros compuestos de reserva (como galactomananos) en semillas de lupino (Buckeridge *et al.*, 2005) resulta en un incremento en la concentración de azúcares reductores. La concentración de estos compuestos es alterada por efecto de tratamientos de germinación que incluyen cambios en temperatura. En semillas de *Lolium rigidum*, en oscuridad durante la liberación de la latencia, se observa degradación de proteasas, disminución de contenidos de almidón, azúcares solubles y lípidos (Goggin *et al.*, 2011). El análisis de la expresión de genes del metabolismo hormonal muestra que los genes son termoinhibidos por altas temperaturas, debido a una estimulación de la biosíntesis de ABA y una disminución de GA en semillas de *Arabidopsis thaliana* (Toh *et al.*, 2008). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de cuatro regímenes de temperaturas, sobre el porcentaje, tasa de germinación y cambios bioquímicos en *Lupinus exaltatus*, *Lupinus campestris*, y *Lupinus montanus*.

3.2. Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizaron semillas maduras de *L. montanus*, *L. exaltatus*, *L. campestris* recolectadas en la región de los Valles de Serdán y Libres, Puebla, México, de septiembre a noviembre 2014. En esta región, las variaciones en temperaturas y precipitación se muestran en el Cuadro 3.1. El beneficio de las semillas se realizó en el Laboratorio Forestal del COLPOS-Campus Montecillo y fueron enviadas al Laboratorio de Fisiología Vegetal del COLPOS-Campus Tabasco, donde se seleccionaron las semillas sanas y se almacenaron a 4°C para su posterior análisis.

Cuadro 3.1. Temperaturas promedio de máximas, mínimas y precipitación por estación del año, en la región de los Valles de Serdán y Libres, Puebla, México de 2012-2015.

Estación	Minima °C	Maxima °C	Precipitación (mm)
Primavera	12.4	27.2	128.4
Verano	12.9	25.9	222.0
Otoño	9.7	24.2	67.9
Invierno	8.1	24.6	24.2

SMN, 2016.

Desinfección de la semilla

Las semillas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2% por tres minutos, posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, previo a la siembra.

Prueba de viabilidad

Antes de la aplicación de los tratamientos de temperatura se realizó una prueba de viabilidad a las semillas de las tres especies. Lotes de 20 semillas de cada especie por triplicado, fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2% y se les realizó una incisión a la testa con ayuda de un bisturí. Enseguida, las semillas se pusieron a imbibir en agua destilada estéril a temperatura ambiente durante 20 min para poder separar la testa de los cotiledones. Los cotiledones de las semillas fueron sumergidos en 5 mL de una solución al 1% de 2, 3, 5 trifenil cloruro de tetrazolio (marca Sigma, código T8877), donde se dejarón reposar por 24 h en la oscuridad; transcurrido el tiempo se contabilizó el número de embriones teñidos (Moreno, 1996).

Curva de imbibición

Después de aplicar los cuatro regímenes de temperatura en estudio, lotes de 10 semillas por triplicado de cada especie, fueron puestos en cajas petri con 10 mL de agua estéril y colocadas en una cámara de crecimiento (Thermo Scientific modelo 818) con un fotoperiodo de 12 h luz. Se tomó el peso inicial de las semillas y posteriormente fueron pesadas a las 8, 24, 36, 48, 96 y 120 h. Finalmente se realizó una curva de imbibición tomando en cuenta el tiempo en h y el peso de las semillas.

Tratamientos de temperatura aplicados

Lotes triplicados de 50 semillas de cada especie, previamente desinfectadas y con un porcentaje de viabilidad superior al 90%, determinado mediante la prueba de tetrazolio, fueron puestos a germinar en cajas petri de plástico entre papel absorbente estéril, en dos cámaras de crecimiento (Thermo Scientific modelo 818 y Lumistell® ICP 19) con fotoperiodo de 12h luz (aproximadamente $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca fluorescente). Durante el tiempo de germinación las semillas fueron regadas diariamente con agua destilada estéril a temperatura ambiente. Los regímenes de temperatura (luz/ oscuridad) aplicados

durante la germinación fueron a) 15°C/10°C, b) 20°C/15°C, c) temperatura constante de 25°C, d) 35°C/25°C (Figura 3.1).

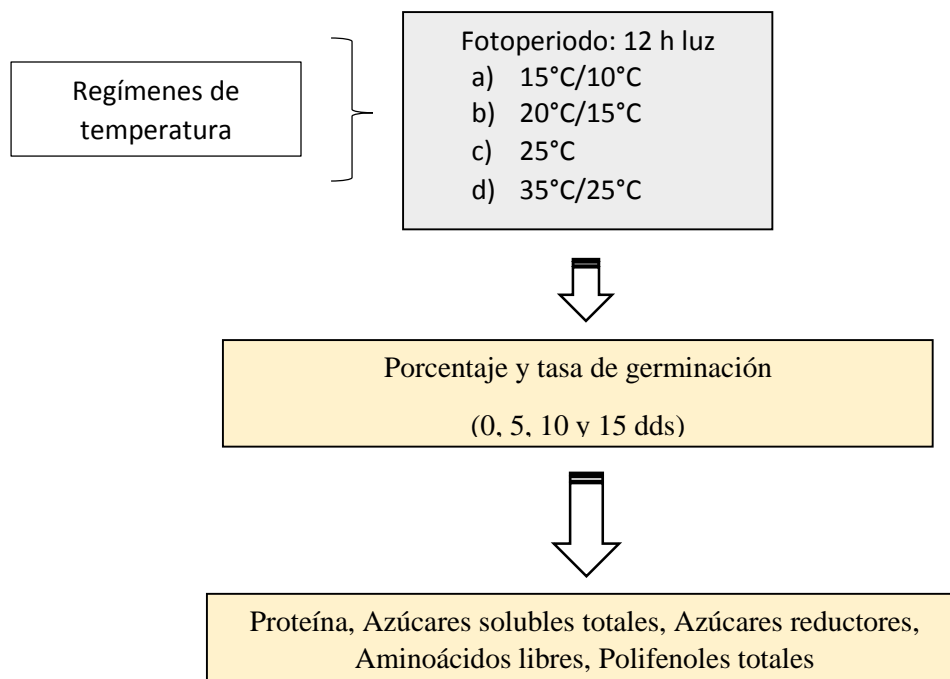


Figura 3.1. Diagrama de flujo de experimento.

Porcentaje y tasa de germinación

Se evaluaron el porcentaje y la tasa de germinación a los 5, 10 y 15 días después de la siembra (dds). Las semillas fueron consideradas germinadas cuando la radícula alcanzó una longitud > 2mm. El conteo se realizó diario. Al final de 15 días todas las semillas remanentes fueron caracterizadas como no germinadas (contabilizando semillas duras y dañadas). Se calculó el porcentaje de germinación y la tasa de germinación con las siguientes ecuaciones:

Porcentaje de germinación (PG): relación entre el número de semillas tratadas y el número de semillas germinadas con la fórmula: $PG = \frac{NTSG \times 100}{NTSS}$, donde NTSG = Número de semillas germinadas, NTSS = Número total de semillas sembradas.

Tasa de germinación (TG), definida como la medida del número de semillas germinadas en relación con el tiempo de germinación; se determinó con la siguiente fórmula: $TG = \sum (n_i)/t$, donde n_i = número de semillas germinadas en día i , t = tiempo de germinación desde la siembra hasta la germinación de la última semilla.

3.2.1. Análisis bioquímicos

Preparación de las muestras

En cada fecha (0, 5, 10, y 15 dds) por tratamiento, el total de semillas (germinadas y no germinadas) fue usado para el análisis bioquímico. Las semillas fueron puestas a secar en una estufa de aire forzado (Shel Lab Modelo: CE3F) a 50°C durante 48 h (Tonguc *et al.*, 2012), posteriormente fueron molidas en mortero y la harina resultante se conservó a 4°C hasta su análisis.

Desengrasado de la muestra

Las muestras fueron desengrasadas por 2 h con hexano al 95% en una relación harina/hexano 1:10 (p/v) en agitación constante a 280 rpm a 4°C. La mezcla fue centrifugada a 10000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se decantó y el precipitado resultante libre de grasa se dejó secar a temperatura ambiente hasta la evaporación total del solvente y finalmente se conservaron hasta antes de su uso a 4°C.

Extracto crudo de proteína soluble

Se pesaron 100 mg de muestras previamente desengrasadas, se les agregaron 2.5 mL de la solución tris-HCL 0.3 mol L⁻¹ pH 8.0 y 0.01 mol L⁻¹ de β -mercaptoetanol, posteriormente fueron agitadas en vortex y se dejaron incubar durante 1 h con agitación cada 10 min. Enseguida fueron centrifugadas a temperatura ambiente por 20 min a 1100 xg, el sobrenadante fue colectado en un tubo de ensayo (Sussulini *et al.*, 2007).

Determinación de proteína

El contenido de proteína total fue estimado por el método de Lowry *et al.* (1951). Del concentrado de proteína se realizó una dilución 1:4 (250 μ L del concentrado más 750 μ L de agua destilada), de esta dilución se tomaron 0.02 mL, se le agregaron 0.7 mL de solución

Lowry, y se dejó incubar en oscuridad 20 min, transcurrido el tiempo se agregaron 0.1 mL del reactivo de Folin Ciocalteu 2N (SIGMA Código F9252) y se dejó incubar 30 min en oscuridad. Para la curva de calibración se preparó una solución estándar de Albumina sérica bovina (BSA, Sigma código A21539). Se pesaron 10 mg de BSA y se diluyeron en 10 mL de agua (concentración de 1 mg/mL). A partir de esta solución se preparó una curva de calibración de concentraciones conocidas entre 0 y 0.2 mg mL⁻¹ (Cuadro A1). Cada análisis se realizó por triplicado, midiéndose la absorbancia a 750 nm. Los resultados, se expresaron como mg g⁻¹ de peso seco (PS).

Extracción de azúcares

Para la extracción, se pesaron por triplicado 200 mg de muestra previamente desengrasada y seca, de cada especie y por tratamiento, en tubos de ensaye de 20 mL de capacidad. A cada muestra se le agregó 3 mL de etanol absoluto y se colocaron a baño María a 70° C por 5 min. Al término el sobrenadante (extracto) fue recuperado en un matraz Erlenmeyer de 50 mL. Este proceso se repitió cuatro veces. El extracto fue secado en una estufa de aire forzado a 70 °C hasta evaporación total; y entonces resuspendido en 1 mL de agua destilada. El extracto fue conservado a -20 °C hasta su uso.

Determinación de azúcares solubles totales

La determinación de azúcares solubles totales se realizó con el método de Somogy (1952). Se preparó una dilución 1:20 (25 µL del extracto más 475 µL de agua destilada) de las muestras, de esta dilución se tomaron 100 µL más 300 µL de agua destilada y 3 mL de Antrona. Los contenidos se mezclaron en vortex y se dejaron enfriar en hielo durante 5 min. Posteriormente se pusieron a baño María a 100 °C durante 10 min. Al término, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Para la curva de calibración se pesaron 12.5 mg de glucosa y se diluyeron en 5 mL de agua (concentración de 2.5 mg/mL), de aquí se tomaron concentraciones conocidas entre 0 y 250 µg/mL para la curva de calibración (Cuadro A2). La absorbancia se leyó 625 nm en un espectrómetro (Thermo Scientific, Multiskan go). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Determinación de azúcares reductores

Para la determinación de azúcares reductores se utilizó el mismo extracto de azúcares totales. Se tomaron 0.5 mL de la muestra y se adicionaron 1.5 mL de agua destilada, 1 mL de la solución alcalina de tartrato de cobre. Las muestras se colocaron en baño María a 100°C durante 10 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se agregó 1 mL de reactivo arsenomolibdico. Finalmente se agregaron 6 mL de agua destilada. Para la curva de calibración se preparó una solución patrón de 2.5 mg/mL de glucosa. A partir de esta solución se preparó la curva de calibración a concentraciones entre 0 y 50 µg/mL (Cuadro A3). La absorbancia se leyó 620 nm en un espectrómetro (Thermo Scientific, Multiskan go). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Determinación de aminoácidos totales

La determinación de aminoácidos se realizó siguiendo el método de Yemm y Cocking (1995). Se tomaron 0.1 mL de la muestra y se completó el volumen a 1 mL con agua destilada, se agregó 1 mL del reactivo ninhidrina, se mezclaron las muestras en vortex y se colocaron en baño María a 100°C durante 15 min. Al término se colocaron en agua fría, finalmente se les añadió 5 mL de etanol al 80%, y se dejaron incubar a temperatura ambiente 10 minutos.

Para la curva de calibración se preparó una solución patrón de Leucina de 1 mg mL⁻¹, de esta solución se preparó una solución con una concentración de 100 µg/mL, realizando a partir de ella soluciones estándar de concentraciones de 0 a 100 µg/mL (Cuadro A4). La absorbancia se leyó 570 nm en un espectrómetro (Thermo Scientific, Multiskan go). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Extracción de polifenoles totales

De la muestra previamente desengrasada se pesaron 250 mg, por triplicado, en tubos eppendorf de 1.5 mL. La extracción se realizó por agitación (1 minuto en vortex) con 1 mL de metanol al 80% (CH₃OH), las muestras fueron colocadas en baño María a 50°C por 15 min y después centrifugadas a 10,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue recuperado en otro tubo, el residuo fue nuevamente lavado y agitado con 0.5 ml de metanol al 100%.

Ambos sobrenadantes fueron recuperados y el volumen se ajustó a 1.5 mL con agua destilada, se almacenó a -20°C protegido de la luz.

Cuantificación de polifenoles totales

Para la cuantificación se tomaron 0.2 mL del extracto obtenido y se les agregaron 1.5 mL agua destilada y 0.1 mL del reactivo Folin-Denis al 50%, posteriormente se agregaron 0.2 mL de carbonato de sodio anhidro al 15% (Na₂CO₃). Los contenidos fueron mezclados en vortex y se dejaron incubar 30 min en la oscuridad. Para la curva de calibración se preparó una solución stock de 100 µg/mL de ácido gálico. Realizando a partir de ella soluciones estándar de concentraciones 0 a 100 µg/mL (Cuadro A5). La absorbancia se leyó 765 nm en un espectrómetro (Thermo Scientific, Multiskan go). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Los datos de porcentaje de germinación fueron transformados a la raíz cuadrada de arcoseno (Elliot *et al.*, 2011) para tener una distribución normal aproximada de los porcentajes, y junto con los de tasa de germinación y análisis bioquímicos, fueron sometidos, por especie, a un análisis de varianza, bajo un diseño completamente al azar en arreglo factorial. El primer factor fue el régimen de temperatura con cuatro niveles (15/10°C, 20/15°C, 25°C, 35/25°C) y el segundo factor fue el tiempo con cuatro niveles (0, 5, 10, 15 dds) y sus interacciones (Régimen de temperatura*Tiempo). Pruebas de medias de Tukey se aplicaron para distinguir diferencias entre tratamientos utilizando el programa estadístico SAS (SAS, 2010).

3.3. Resultados y Discusión

3.3.1. Prueba de viabilidad

La prueba topográfica de tetrazolio se fundamenta en la reacción bioquímica de ciertas enzimas de las células vivas con la sal de tetrazolio, la cual consiste en la reducción del tetrazolio hasta formar un compuesto rojo llamado formazán. Los embriones que toman una coloración rojo intenso están viables, si su color es rosa pálido es un indicativo de muerte o poca viabilidad de las células embrionarias (Moreno, 1996) (Figura 3.2). El porcentaje de

viabilidad determinado con esta prueba en *L. exaltatus* fue de 93.3% en *L. campestris* y *L. montanus* fue de 90.6 y 96.6 %, respectivamente.

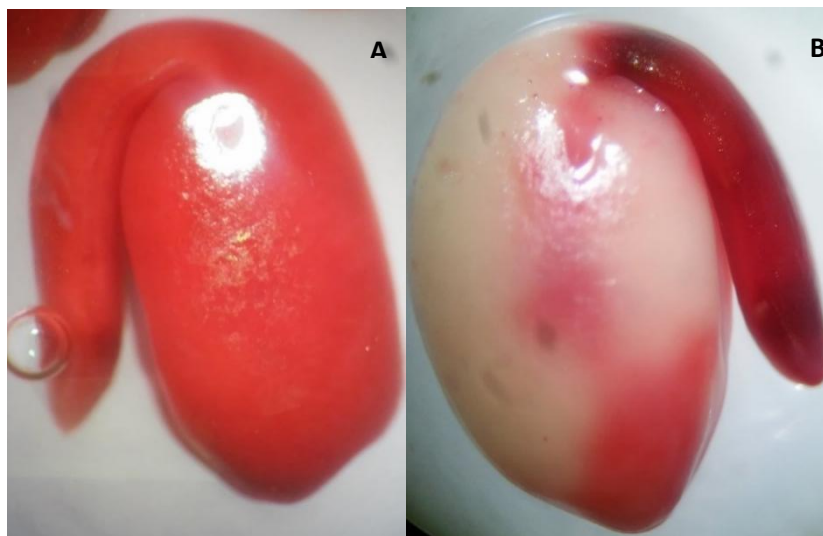


Figura 3.2. Semillas de *L. montanus* (A) viable y semilla de *L. campestris* (B) no viable determinada mediante la aplicación topográfica con tetrazolio.

3.3.2. Curvas de imbibición

A continuación se muestran los resultados de las curvas de imbibición por especie bajo diferentes regímenes de temperatura (Figura 3.3).

En la especie *L. exaltatus* (Figura 3.3, A) las temperaturas que indujeron mayor absorción de agua, estimada por el incremento en peso de las semillas, fueron 25-25°C y 35-25°C y el menor incremento de peso se observó en el régimen 15-10°C. En semillas de *L. campestris* (Figura 3.3, B) el régimen que favoreció la mayor absorción de agua fue 25-25°C seguido de la temperatura 20-15°C; en la temperatura 15-10°C la ganancia de peso fue mínima.

En cuanto a la especie *L. montanus* (Figura 3.3, C) los regímenes donde se observó mayor ganancia de peso fueron en 20-15°C y 15-10°C, el régimen donde la semilla absorbió menor cantidad de agua fue en 35-25°C. Los resultados obtenidos en las curvas de imbibición en las tres especies presentan una respuesta diferencial a la temperatura, estos resultados podrían estar relacionados con las temperaturas donde se desarrollan estas especies, por ejemplo las semillas de *L. exaltatus* y *L. campestris* presentaron mayor ganancia de peso en el tratamiento 25-25°C y se desarrollan en altitudes más bajas (2866 y 3066 msnm, respectivamente) donde las temperaturas son más cálidas, por el contrario *L. montanus* ganó

más peso con el régimen 20-15°C, posiblemente por que las temperaturas donde crece esta especie son más frías debido a que se encuentran a 3442 msnm. El efecto positivo del tratamiento de 25-25°C en ganancia de peso en *L. exaltatus* y *L. campestris* podría ser porque las temperaturas altas (dentro de los límites de la actividad biológica) incrementan la rapidez con la que el agua entra en las semillas y favorecen la disolución temprana de los solutos, lo que acelera procesos enzimáticos resultando en una rápida imbibición y germinación (Bewley y Black, 1982).

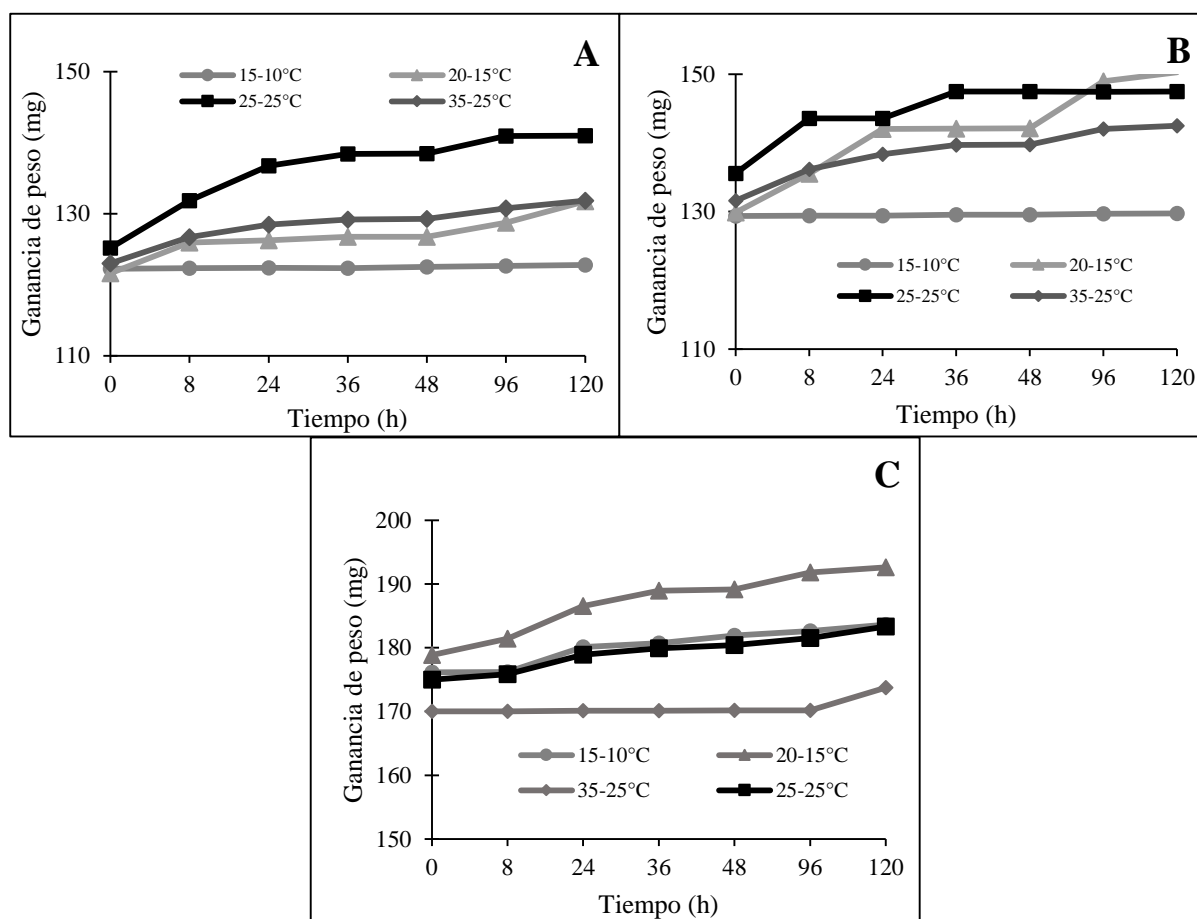


Figura 3.3. Efecto de regímenes de temperatura sobre la ganancia de peso (imbibición) de semillas de *Lupinus* a las 0, 8, 24, 36, 48, 96, 120 h. A) *L. exaltatus*, B) *L. campestris*, C) *L. montanus*.

3.3.3. Porcentaje de germinación (PG)

La temperatura es el segundo factor ambiental más importante para inducir la germinación debido a que determina la capacidad y la tasa de germinación en semillas no latentes,

remueve la latencia primaria o secundaria, e induce latencia secundaria (Bewley *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la alternancia de temperaturas entre el día y la noche incrementan la germinación en semillas de Fabáceas que exhiben latencia física (Van-Assche *et al.*, 2003).

Los regímenes de temperaturas afectaron significativamente el PG y TG en *L. montanus*. Mientras que, el tiempo afectó significativamente la tasa de germinación (TG) en *L. campestris* y *L. exaltatus*. La interacción Régimen de temperatura*tiempo fue no significativa (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Análisis de varianza de diferentes regímenes de temperatura y el tiempo sobre el porcentaje y tasa de germinación (semillas día⁻¹) en semillas de *Lupinus*.

Fuente de variación	GL	Cuadrado Medio	
		Porcentaje de germinación	Tasa de germinación
<i>L. campestris</i>			
Régimen de temperatura (R)	3	14.23ns	0.04ns
Tiempo	2	8.60ns	0.19**
R*Tiempo	6	1.22ns	0.01ns
Error	48	8.88ns	
<i>L. exaltatus</i>			
Régimen de temperatura (R)	3	35.48ns	0.09ns
Tiempo	2	21.48ns	0.42**
R*Tiempo	6	3.16ns	0.02ns
Error	48	12.91	0.05
<i>L. montanus</i>			
Régimen de temperatura (R)	3	141.20***	0.45***
Tiempo	2	3.00ns	0.15ns
R*Tiempo	6	2.07ns	0.07ns
Error	33	13.55	0.05

ns: no significativo; **($p < 0.01$); ***($p < 0.0001$); GL= grados de libertad

En el presente estudio, la alternancia de temperaturas no incrementó el porcentaje de germinación (PG) promedio a más del 8% en las tres especies y en los cuatro regímenes de temperatura probados (Figura 3.4). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas por efecto del tiempo de germinación (5, 10, 15dds) (Figura 3.5) entre especies. La germinación de *L. montanus* fue afectada favorablemente por los regímenes 15/10°C y 20/15°C y el de 35-25°C la inhibió. De acuerdo con Bewley *et al.* (2013), en

regiones templadas, la latencia de semillas hidratadas es lentamente liberada durante el invierno. En el caso de *L. montanus* es la especie que se encuentra a mayor altitud en la región de estudio (3442 msnm), donde las temperaturas son más frías que los sitios donde crecen *L. campestris* y *L. exaltatus* (2866 y 3066 msnm, respectivamente). Estas últimas dos especies parecen tener un mayor rango de adaptación a germinar desde temperaturas 15-10°C hasta las de 35-25°C.

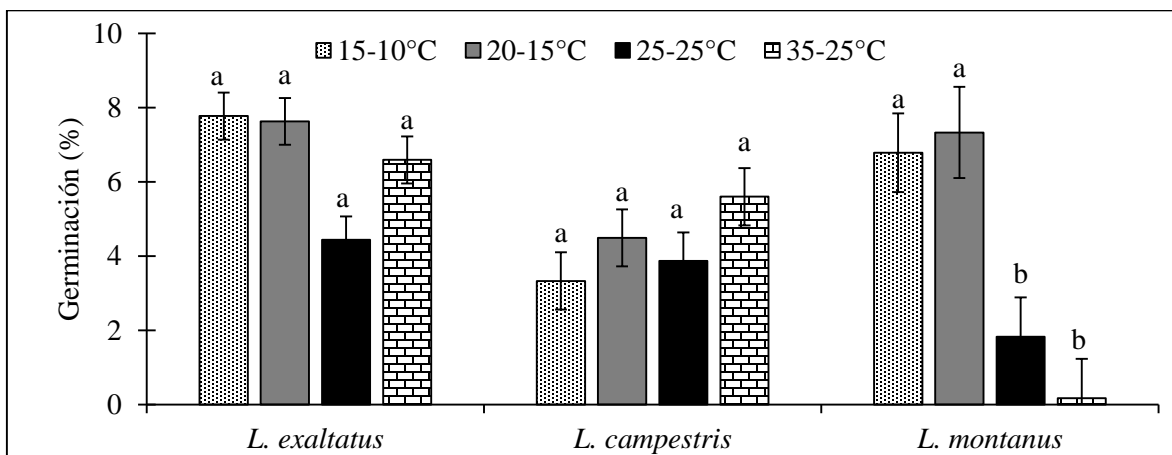


Figura 3.4. Promedio del porcentaje de germinación de tres especies de *Lupinus* bajo diferentes regímenes de temperatura. Medias con una letra común por especie no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

La baja respuesta a los regímenes probados puede ser porque estas especies requieren un intervalo más amplio entre las temperaturas diurnas y las nocturnas para promover germinación. Esto porque bajo condiciones naturales, en el verano y otoño, el intervalo de temperaturas donde crecen, es de al menos 15-20°C, lo que puede dar lugar a una germinación escalonada y lenta en el tiempo. Pero también muestra la variación entre fechas de cosecha, ya que en *L. exaltatus* cosechado en la misma región en el año 2012, con el tratamiento 20-15°C se alcanza un 20% de germinación a los 30 dds (Pablo-Pérez *et al.*, 2013).

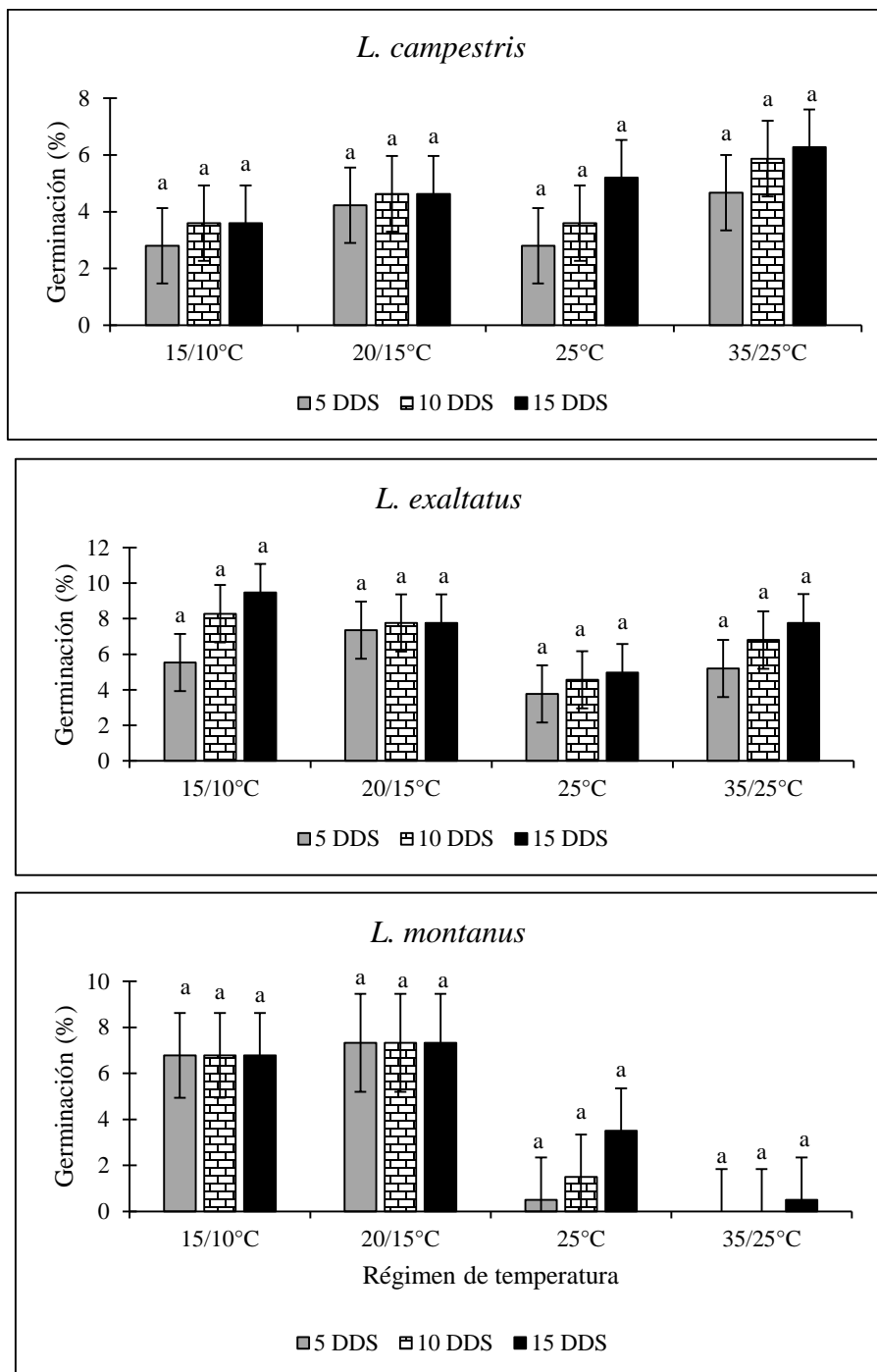


Figura 3.5. Efecto de diferentes regímenes de temperatura sobre el porcentaje de germinación a los 5, 10 y 15 dds. Medias con una letra común por régimen de temperatura no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

En *L. montanus*, la menor germinación ocurrió en los regímenes de 25°C y 35/25°C y se mantuvo durante el tiempo de germinación. Este efecto negativo de los tratamientos 25-25

y 35-25°C también ha sido observado por Mackay *et al.* (2001) en semillas de *Lupinus arboreus* donde las temperaturas mayores a 32°C inhiben la germinación y la mejor temperatura de germinación fue en un rango de 21-14°C (>80%). Esta misma respuesta a la germinación de *L. montanus* fue observada por Acosta-Percastegui y Rodríguez-Trejo (2005) en la misma especie, colectada en el Estado de México, donde el PG se incrementó con temperaturas de 20-15°C y disminuyó con temperaturas 30-25°C. Para una germinación rápida y homogénea, las especies en estudio requerirán de someterlas a tratamientos de escarificación para debilitar la testa o fragmentarla.

3.3.4. Tasa de Germinación (TG)

El Cuadro 3.3 muestra que no hubo efecto de régimen de temperatura sobre la TG de las semillas en estudio, con excepción de las de *L. montanus*. Aún cuando no se observan diferencias entre regímenes por especie, en el régimen 20/15°C *L. exaltatus* y *L. montanus* mostraron la mayor tasa de germinación (0.43 y 0.45 semillas día⁻¹, respectivamente). Este régimen también incrementó la tasa de germinación en *L. campestris*. En *L. montanus* se puede observar que los tratamientos 25-25 y 35-25°C afectaron negativamente la TG, esto al igual que el PG podría estar relacionado con las condiciones climáticas donde se desarrollan estas especies.

Cuadro 3.3. Tasa de germinación de especies de *Lupinus* por efecto de régimen de temperatura.

Régimen temperatura	<i>L. campestris</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. montanus</i>
	Tasa de germinación semillas día ⁻¹		
15/10°C	0.19 a	0.40 a	0.34 a
20/15°C	0.26 a	0.43 a	0.45 a
25-25°C	0.21 a	0.25 a	0.08 b
35/25°C	0.31 a	0.37 a	0.01 b

Medias con una letra común por especie no son significativamente diferentes (p > 0.05)

3.3.5. Análisis bioquímicos

La imbibición de semillas es un proceso que ocasiona cambios en la composición de las reservas (Kuo *et al.*, 2004), debido a la activación del metabolismo interno de la semilla para el proceso germinativo. Los principales cambios que se pueden observar son un incremento en la respiración y el inicio de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Bewley, 2001;

Bewley *et al.*, 2013). Dada la baja germinación (<8%) observada con los regímenes de temperatura probados, las variaciones en la concentración de proteína soluble, aminoácidos libres, azúcares reductores, azúcares solubles totales y polifenoles totales a los 0, 5, 10 y 15 dds, son efecto de la entrada de agua a los cotiledones, sin llegar a la protrusión de la radícula.

3.3.5.1. Proteína Soluble

Las proteínas son la mayor fuente de aminoácidos durante la germinación para el crecimiento del embrión y el posterior crecimiento de las plántulas (Bewley *et al.*, 2013). El factor temperatura indujo un efecto significativo ($p < 0.0001$) sobre el contenido de proteína en las especies y se observó un efecto significativo de la interacción especie*tiempo (Cuadro 3.4). El factor tiempo no fue significativo en ninguna especie.

Cuadro 3.4. Análisis de varianza del efecto de la especie y el tiempo sobre el contenido de proteína soluble en diferentes especies.

Factor de variación	GL	<i>L. campestris</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. montanus</i>
		Cuadrado Medio		
Régimen de temperatura (RG)	3	53541***	40842***	14227**
Tiempo	3	4431ns	1700ns	1414ns
RG*Tiempo	9	11269**	6873**	4924*
Error	53	2227	1442	1948

ns: no significativo; *($p < 0.05$); ***($p < 0.0001$); GL= grados de libertad

En las tres especies evaluadas, la mayor concentración de proteína se observó en las temperaturas 15-10 y 20-15°C (Figura 3.6).

En el Cuadro 3.5 se muestran los cambios en el contenido de proteína durante 0, 5, 10, 15 días después de siembra (dds) de semillas de *Lupinus* bajo diferentes regímenes de temperatura. El régimen 15-10°C mostró menor imbibición de agua en *L. campestris* y *L. exaltatus* e incrementó la concentración de proteína a los 10 dds; seguido del régimen de 20-15°C. De acuerdo con Nonogaki *et al.* (2010) este incremento en el contenido de proteína podría estar asociado a la entrada de agua y oxígeno, lo que inició la síntesis de aminoácidos para el crecimiento celular en esta primera etapa del proceso de germinación, aún cuando el porcentaje final de germinación haya sido inferior al 8%.

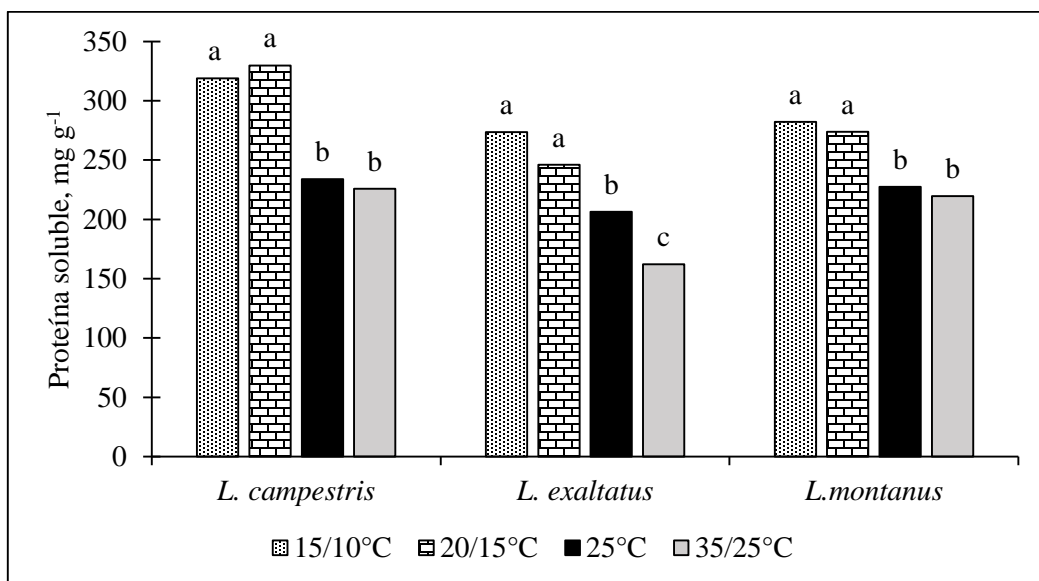


Figura 3.6. Efecto de regímenes de temperatura sobre la concentración de proteína soluble (mg g^{-1} PS) en semillas de *Lupinus* spp durante la germinación.

Cuadro 3.5. Efecto de diferentes regímenes de temperatura sobre la concentración de proteína durante la germinación (0, 5, 10, 15 dds) de *Lupinus* spp (mg g^{-1} de PS).

Días después de siembra	<i>L. campestris</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. montanus</i>
15-10°C			
0	279.1 bcdef	225.9 abc	252.3 abc
5	303.6 abcdef	259.7 ab	270.0 abc
10	410.6 a	304.7 a	317.9 a
15	282.5 bcdef	303.9 a	288.8 abc
20-15°C			
0	256.5 bcdef	198.0 bc	238.3 abc
5	361.5 ab	248.3 ab	290.4 abc
10	344.3 abcd	260.3 ab	265.9 abc
15	357.0 abc	277.2 ab	300.5 ab
25-25°C			
0	270.4 bcdef	197.3 bc	256.4 abc
5	271.9 bcdef	209.39 bc	290.4 abc
10	199.7 ef	138.5 cd	193.3 bc
15	194.2 ef	103.8 d	172.8 c
35-25°C			
0	246.0 cdef	211.9 bc	218.5 abc
5	189.6 f	205.3 bc	208.9 abc
10	235.1 def	208.2 bc	212.3 abc
15	231.9 def	199.7 bc	239.1 abc

Medias con una letra común por columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Reducciones importantes en la concentración de proteína se observaron en el tratamiento 25-25°C, donde hubo mayor imbibición en *L. campestris* y *L. exaltatus*. Estas fueron de 30.4, 54.0 y 31.5% en *L. campestris*, *L. exaltatus*, y *L. montanus*, respectivamente. Disminuciones de proteína por efecto de temperaturas moderadas también han sido reportada en semillas de *E. heterophylla*, *Cereus jamacaru*, *Lupinus termis*, *Lupinus luteus* y *Lupinus angustifolius* (Olczak *et al.*, 1992; Ahmed *et al.*, 1993; Suda y Giorgini, 2000; Alencar *et al.*, 2011; Satyanarayana *et al.*, 2011).

3.3.5.2. Aminoácidos Libres (AA)

En el Cuadro 3.6 se presenta el análisis de varianza del efecto del régimen de temperatura sobre la concentración de AA. El régimen de temperatura, tiempo y la interacción temperatura*tiempo afectaron significativamente la concentración de AA de *L. campestris* y *L. exaltatus*.

Cuadro 3.6. Análisis de varianza del efecto de la temperatura sobre la concentración de Aminoácidos libres durante la germinación.

Factor de variación	GL	<i>L. campestris</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. montanus</i>
		Cuadrado Medio		
Régimen de temperatura (RT)	3	58.3*	375.3***	9.47ns
Tiempo	3	110.7**	110.0*	35.27ns
RT*Tiempo	9	43.9**	87.9**	3.98ns
Error	53	13.9	26.4	18.12

ns: no significativo; *(p < 0.05) ; ***(p < 0.0001); GL= grados de libertad.

La Figura 3.7 muestra la concentración promedio de AA en semillas de *Lupinus* durante la germinación bajo diferentes regímenes de temperatura. La mayor concentración de AA es en *L. exaltatus* en el régimen 15-10°C (25 mg g⁻¹), seguidas de la del régimen 20/15°C (19.40 mg g⁻¹). En *L. campestris* la mayor concentración de AA fue en 35-25°C (18.21 mg g⁻¹). *L. montanus* no presentó diferencias en AA por efecto del régimen de temperatura. Este resultado está relacionado con los resultados en la concentración de proteína debido a que la mayor síntesis de proteína se observó en los tratamientos 15-10 y 20-15°C.

El Cuadro 3.7 muestra el efecto de los regímenes de temperaturas sobre la concentración de AA en las tres especies a los 0, 5, 10 y 15 dds. En el tratamiento de 15-10°C se observó un incremento en la concentración de AA en *L. campestris* y *L. exaltatus*. Las concentraciones más bajas de AA fueron observadas en el tratamiento de 25-25°C.

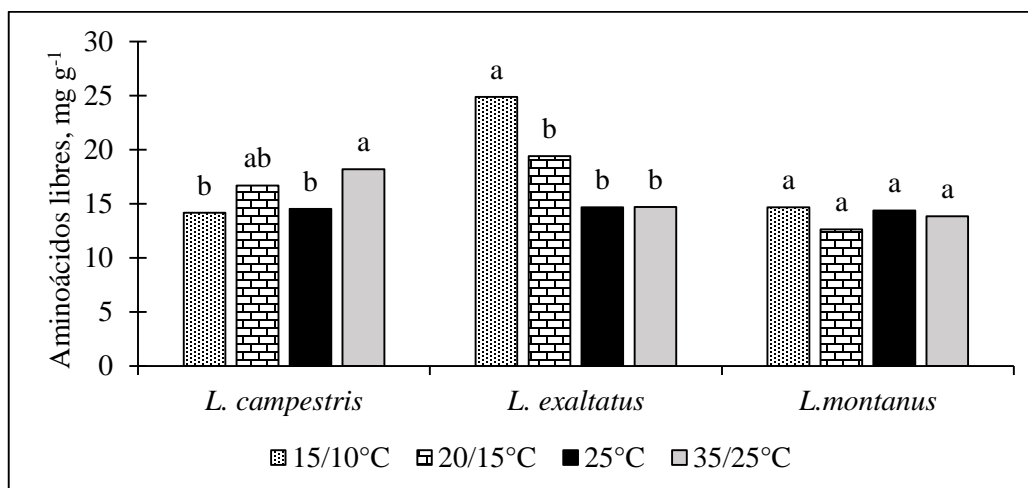


Figura 3.7. Efecto del régimen de temperatura durante la germinación sobre la concentración final de aminoácidos libres (mg g^{-1} PS) en tres especies de *Lupinus* spp.

Cuadro 3.7. Efecto de la temperatura sobre la concentración de aminoácidos libres (mg g^{-1} PS) durante 0, 5, 10, 15 días después de siembra en semillas de *Lupinus* bajo distintos regímenes de temperatura.

Días después de siembra	<i>L. campestris</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. montanus</i>
15-10°C			
0	10.3 c	17.4 abcd	13.2 a
5	15.4 abc	28.8 ab	15.8 a
10	18.3 abc	23.2 abcd	14.1 a
15	12.4 c	30.0 a	15.5 a
20-15			
0	16.0 abc	14.5 cd	11.2 a
5	24.7 a	15.8 bcd	14.9 a
10	14.2 bc	27.6 abc	13.8 a
15	11.7 c	19.6 abc	10.5 a
25-25°C			
0	14.1 c	12.4 d	12.8 a
5	16.3 abc	21.3 abcd	16.7 a
10	16.2 abc	10.9 d	15.7 a
15	11.7 c	14.0 d	12.2 a
35-25°C			
0	17.4 abc	14.4 cd	13.4 a
5	15.7 abc	17.5 abcd	16.3 a
10	23.7 ab	12.6 d	14.4 a
15	15.9 abc	14.1 d	11.3 a

Medias con una letra común por columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

En *L. montanus* no se observó efecto del régimen de temperatura durante la germinación en la concentración de AA. El incremento de aminoácidos en ciertos días durante la imbibición podría deberse a la activación del metabolismo que prepara las condiciones para crecimiento del embrión y protrusión de la radícula, por lo que inicia una rápida hidrólisis de las proteínas lo cual resulta en un incremento de AA. Estos AA posteriormente son utilizados para la germinación (Bewley *et al.*, 2013).

3.3.5.3. Azúcares Solubles Totales (AST)

Las fracciones de azúcares solubles incluyen monosacáridos (ribosa, glucosa, galactosa, fructuosa) y disacáridos (sucrosa y maltosa) (Berrios *et al.*, 2010). Durante la germinación, los azúcares almacenados en las semillas son consumidos por la demanda de energía de este proceso (Bewley *et al.*, 2013). A continuación se muestra el análisis de varianza en las concentraciones de azúcares solubles durante la germinación (Cuadro 3.8). El efecto de régimen de temperatura, tiempo y la interacción temperatura*tiempo fue significativa para los AST en todas las especies.

Cuadro 3.8. Análisis de varianza del efecto de la temperatura sobre la concentración de azúcares solubles totales en tres especies de *Lupinus* durante la germinación.

Factor de variación	GL	<i>L. campestris</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. montanus</i>
		Cuadrado Medio		
Régimen de temperatura (RT)	3	191356***	117813***	86020***
Tiempo	3	60071***	46773***	21853**
RT*Tiempo	9	30733***	28169***	30176***
Error	53	3066	2788	3625

** (p<0.01),***(p< 0.0001); GL= grados de libertad

En la Figura 3.8 se muestran las concentraciones promedio de AST por especie en los regímenes de temperatura probados. La mayor concentración promedio de AST se observó en el régimen de 20-15°C en las tres especies (496.6 mg g⁻¹, 476.84 mg g⁻¹ y 497.57 mg g⁻¹ para *L. campestris*, *L. exaltatus* y *L. montanus*, respectivamente), seguido del régimen de 15-10°C

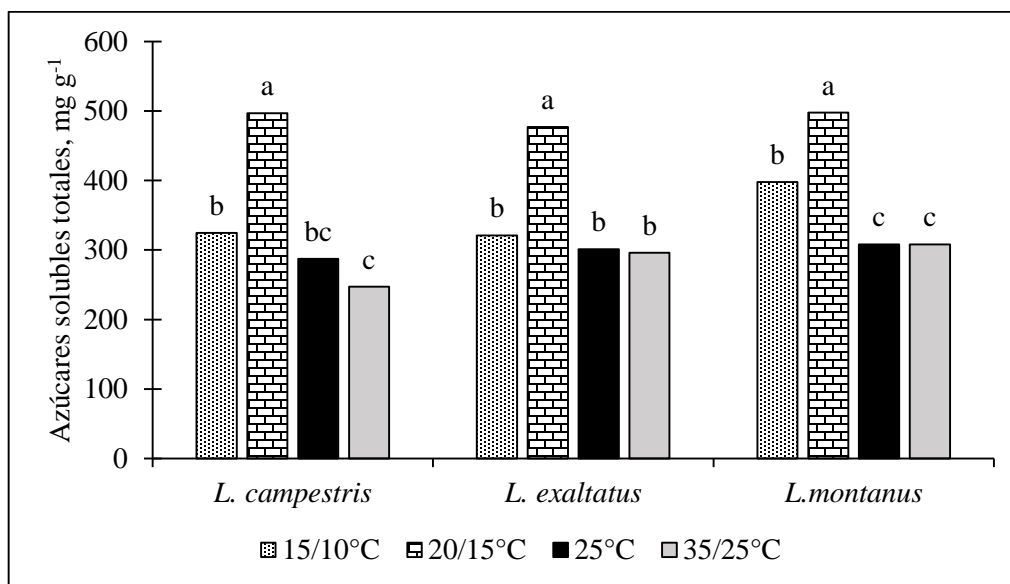


Figura 3.8. Efecto de alternancias de temperatura sobre la concentración promedio de Azúcares solubles totales (mg g^{-1} PS) en tres especies de *Lupinus*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

El Cuadro 3.9 muestra los cambios en la concentración de AST en las tres especies en estudio durante 0, 5, 10 y 15 dds. Por lo general se observó que durante la germinación la concentración de AST se incrementó en los cuatro regímenes en los días 5 y 10 y posteriormente se redujeron en el día 15 (> disminución en los regímenes 25-25°C y 35-25°C). Esto podría deberse a que durante la germinación hay gran demanda de carbohidratos debido a la necesidad de fuentes energía para el crecimiento de la radícula y posteriormente de las plántulas (Nonogaki *et al.*, 2010; Bewley *et al.*, 2013; Rosental *et al.*, 2013). Esta disminución en las reservas de azúcares solubles también ha sido observado en semillas de *Lupinus albus*, *Lupinus luteus*, *Cereus jamacaru*, *Carthamus tinctorius* L., *Sterculia urens* Roxb y *Erythrina velutina* (Muzquiz *et al.*, 1992; Satyanarayana *et al.*, 2011; Alencar *et al.*, 2012; Tonguc *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2012). También en semillas de *L. campestris* se ha observado una disminución de un 15% a partir del primer día de germinación en el contenido de AST (Jiménez-Martínez., 2012).

Cuadro 3.9. Efecto de los regímenes de temperatura sobre la concentración de azúcares solubles totales (mg g⁻¹ PS) a los 0, 5, 10 y 15 días después de siembra en *Lupinus* spp.

Días después de siembra	<i>L. campestris</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. montanus</i>
15-10°C			
0	363.4 de	351.1 bcde	375.4 abcd
5	355.7 de	361.4 bcde	401.5 abcd
10	328.9 def	271.9 efg	360.6 bcd
15	250.4 efg	299.0 def	453.3 abc
20-15°C			
0	356.8 de	396.1 abcde	394.9 abcd
5	604.2 a	531.2 a	515.5 abc
10	519.2 ab	496.7 a	530.09 ab
15	506.1 abc	483.3 ab	549.5 a
25-25°C			
0	407.5 bcd	408.2 abcde	426.4 abc
5	374.0 cde	461.4 abc	418.0 abc
10	192.1 fgh	149.9 g	238.8 def
15	176.0 gh	185.0 fg	148.0 f
35-25°C			
0	313.3 defg	347.3 cde	391.1 abcd
5	270.3 defg	286.7 def	384.0 abcd
10	305.0 defg	343.5 cde	347.9 cde
15	100.1 h	206.4 fg	172.4 ef

Medias con una letra común por columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

El aumento en la concentración de AST durante la germinación de *L. montanus* en las temperaturas 15-10°C y 20-15°C puede deberse a que las plántulas de esta especie, por localizarse en altitudes superiores a los 3000 msnm, en temperaturas bajas se desarrollan mejor y a esa edad (15 dds) parecen tener la capacidad de formar cloroplastos (cotiledones verdes) e iniciar fotosíntesis, y de esta manera generan azúcares. En las temperaturas de 25-25 y 35-25 °C no se observa este efecto.

3.3.5.4. Azúcares reductores (AR)

Los azúcares reductores son aquellos que poseen un grupo carbonilo (C=O) intacto y que a través de este enlace pueden reaccionar como reductores con otras moléculas; todos los monosacáridos son azúcares reductores por que contienen al menos un –OH hemiacetálico libre, por ejemplo la glucosa y la fructuosa, también algunos disacáridos tienen poder reductor como la lactosa, maltosa y la celobiosa (Feduchi *et al.*, 2015). Durante las primeras horas del proceso de germinación hay hidrólisis de oligosacáridos lo que podría resultar en un incremento en la concentración de azúcares reductores (Buckeridge *et al.*, 2005).

El Cuadro 3.10 muestra el análisis de varianza del efecto régimen de temperatura, tiempo y su interacción sobre la concentración de azúcares reductores en tres especies de *Lupinus*. En *L. campestris* y *L. montanus* el factor régimen de temperatura fue significativo. El factor tiempo fue significativo para *L. exaltatus* y *L. montanus*; la interacción régimen de temperatura*tiempo fue significativa para *L. campestris* y *L. exaltatus*.

Cuadro 3.10. Análisis de varianza del efecto de la temperatura sobre la concentración de Azúcares Reductores durante la germinación en tres especies de *Lupinus* spp.

Factor de variación	GL	<i>L. campestris</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. montanus</i>
		Cuadrado Medio		
Régimen de temperatura (RT)	3	10.14***	1.58ns	2.16**
Tiempo	3	0.78	3.10*	0.90*
RT*Tiempo	9	1.16**	2.87**	0.64ns
Error	53	0.28	0.70**	0.29

ns: no significativo; *($p < 0.05$) ;**($p < 0.01$) ;***($p < 0.0001$); GL= grados de libertad

La Figura 3.9 muestra que las concentraciones promedio de AR se reducen significativamente en *L. campestris* y *L. montanus* con los regímenes de temperatura de 20-15°C, 25-25°C y 35-25°C, con excepción de las semillas de *L. exaltatus*.

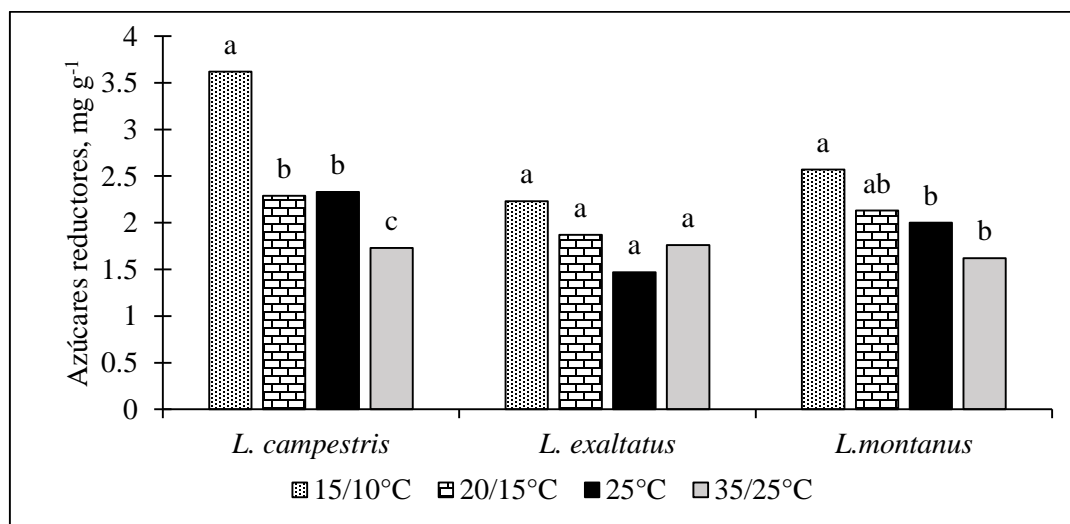


Figura 3.9. Efecto del régimen de temperatura durante la germinación sobre la concentración promedio de azúcares reductores (mg g^{-1} PS) en tres especies de *Lupinus*. Medias con una letra común por especie no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Los cambios en la concentración de AR durante 0, 5, 10 y 15 dds en diferentes tratamientos de temperaturas se muestran en el Cuadro 3.11. En el régimen 15-10°C se observó un incremento de la concentración de AR en las tres especies y en los regímenes 20-15°C y 25-25°C la concentración de AR disminuyó a los 15 dds. La concentración de AR se incrementó en el día 15 en el tratamiento de 35-25°C en las tres especies. En cotiledones de *Lupinus luteus* también ha sido reportado un incremento en la concentración de AR durante la germinación (Mathenson y Harpal, 1977).

Cuadro 3.11. Efecto del régimen de temperatura sobre la concentración de azúcares reductores (mg g⁻¹ PS) a los 0, 5, 10 y 15 días después de siembra en semillas de *Lupinus* spp.

Días después de siembra	<i>L. campestris</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. montanus</i>
15-10°C			
0	2.96 bc	1.34 b	2.42 abc
5	4.52 a	1.85 ab	2.66 ab
10	3.95 ab	1.86 ab	2.58 ab
15	3.0 bc	3.84 a	2.61 ab
20-15°C			
0	2.54 cd	1.48 b	1.83 abc
5	2.48 cd	2.82 ab	2.60 ab
10	2.42 cd	1.96 ab	3.05 a
15	1.72 cd	1.20 b	1.03 c
25-25°C			
0	2.68 bcd	1.56 b	1.59 abc
5	2.66 bcd	2.29 ab	2.43 abc
10	1.99 cd	0.93 b	1.99 abc
15	1.98 cd	1.10 b	1.98 abc
35-25°C			
0	2.01 cd	1.13 b	1.33 bc
5	1.35 d	1.43 b	1.60 abc
10	1.42 d	1.44 b	1.50 bc
15	2.16 cd	3.05 ab	2.06 abc

Medias con una letra común por columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

3.3.5.5. Polifenoles totales (PFT).

Una de las razones para medir PFT es porque estos metabolitos intervienen en el proceso de germinación. Durante este proceso se oxidan flavonoides y esta oxidación puede influir de

manera muy importante no sólo en la limitación de absorción del agua, sino también en restringir el suministro de oxígeno al embrión (Debeaujon *et al.*, 2000).

De acuerdo con el análisis de varianza (Cuadro 3.12), el factor régimen de temperatura tuvo un efecto altamente significativo (*L. campestris* y *L. exaltatus*) y significativo (*L. montanus*) en la concentración de polifenoles totales. El factor tiempo y la interacción régimen de temperatura*tiempo afectaron significativamente a *L. exaltatus* y *L. montanus*.

Cuadro 3.12. Análisis de varianza del efecto del régimen de temperatura sobre la concentración de polifenoles totales en tres especies de *Lupinus*, durante la germinación.

Factor de variación	G L	<i>L. campestris</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. montanus</i>
		Cuadrado Medio		
Régimen de temperatura (RT)	3	4.20***	1.57***	0.43**
Tiempo	3	0.23ns	0.23***	0.97***
RT*Tiempo	9	0.26ns	0.13***	0.25*
Error	53	0.50	0.02	0.08

*(p <0.05) ;**(p<0.01) ;***(p< 0.0001); GL= grados de libertad

La concentración final de PFT de cada especie por régimen de temperatura se presenta en la Figura 3.10. La mayor concentración de PFT se observa en *L. exaltatus* y *L. campestris* en comparación con *L. montanus* en todos los regímenes de temperatura. Esto difiere de lo reportado por Campos-Vega *et al.* (2010) que indica que las semillas de testa oscura presentan mayor concentración de compuestos fenólicos. Las semillas de *L. montanus* empleadas en este estudio son más oscuras que las de *L. campestris* y *L. exaltatus*, y sin embargo presentaron menor concentración de compuestos fenólicos (Figura 3.11).

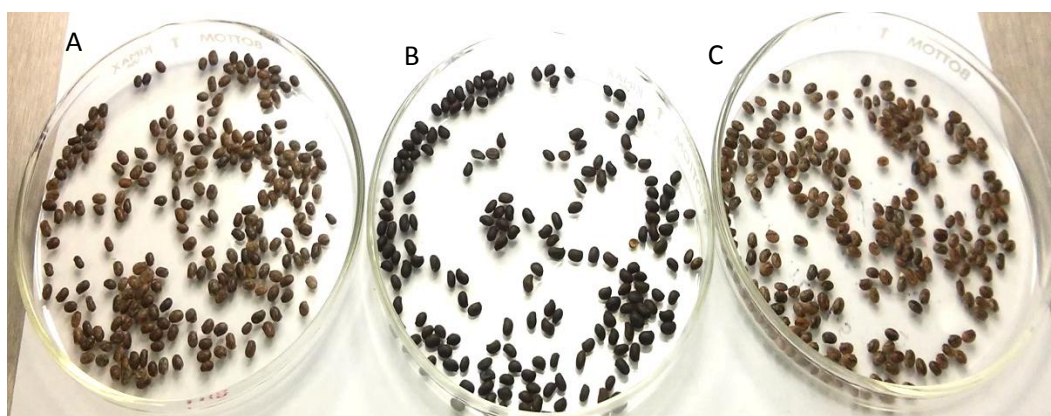


Figura 3.11. Semillas de *L. exaltatus* (A), *L. montanus* (B), *L. campestris* (C).

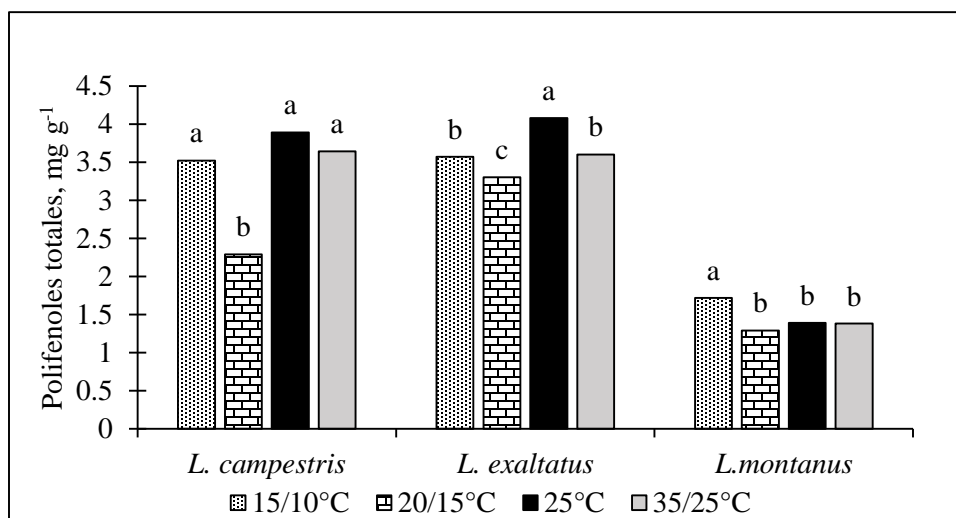


Figura 3.10. Efecto del régimen de temperatura sobre la concentración final de polifenoles totales (mg g^{-1} PS) durante la germinación de tres especies de *Lupinus*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

A continuación en el Cuadro 3.13 se muestra el comportamiento de los PFT en los diferentes regímenes de temperaturas durante la germinación. En *L. campestris*, no se observaron diferencias entre tratamientos durante el tiempo de germinación. En *L. exaltatus*, se observó un incremento en el tiempo en la concentración de PFT en los regímenes 25-25°C y 35-25°C, y en *L. montanus* en el tratamiento de 15-10°C. Incrementos en la concentración de PFT durante la germinación han sido reportados por Dueñas *et al* (2009) en semillas de *Lupinus angustifolius* L. y por Suryanti *et al.* (2016) en semillas de *Leucaena leucocephala*. Aunque en las especies en estudio, más del 90% de las semillas no germinaron, por lo que los incrementos en PFT no podrían atribuirse a germinación, sino más bien a reinicio de actividades metabólicas durante la primera fase del proceso germinativo, donde la entrada de agua y oxígeno los inicia. Cambios bioquímicos de las semillas durante el proceso de germinación, pueden producir algunos metabolitos secundarios, tales como flavonoides o la liberación de agliconas de los glucósidos debido a la activación enzimática (Ribeiro *et al.*, 2006).

Cuadro 3.13. Efecto del régimen de temperatura sobre la concentración de polifenoles totales (mg g⁻¹ PS) durante 0, 5, 10 y 15 días después de siembra en *Lupinus* spp.

Días después de siembra	<i>L. campestris</i>	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. montanus</i>
15-10°C			
0	3.44 a	3.56 cdef	1.02 cd
5	3.50 a	3.44 defg	1.84 abc
10	3.43 a	3.62 cdef	1.94 ab
15	3.71 a	3.64 cde	2.08 a
20-15°C			
0	3.21 a	3.25 fg	0.98 cd
5	2.65 a	3.41 defg	1.27 abcd
10	2.62 a	3.31 efg	1.72 abcd
15	2.66 a	3.24 fg	1.39 abcd
25-25°C			
0	4.00 a	4.09 ab	0.90 d
5	3.94 a	4.09 ab	1.03 cd
10	3.68 a	4.24 a	1.82 abc
15	3.96 a	3.88 abc	1.80 abc
35-25°C			
0	3.80 a	3.73 bcd	1.42 abcd
5	3.84 a	3.78 bcd	1.32 abcd
10	3.79 a	3.79 bcd	1.39 abcd
15	3.13 a	3.09 g	1.39 abcd

Medias con una letra común por columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

3.4. Conclusiones

- Los regímenes de temperatura probados no incrementaron significativamente la germinación en las especies en estudio, durante los tiempos de germinación evaluados.
- Los tratamientos promovieron hasta el 9.4 % de germinación a los 15 dds con una tasa de germinación de 0.45 semillas día⁻¹ en las especies en estudio, pero el 90.6% permaneció sin germinar.
- El tratamiento 35-25°C afectó negativamente el PG de las semillas de *L. montanus* (0.17%), por el contrario en temperaturas de 20-15°C se incrementó el PG (7.3%), caso contrario para *L. campestris*. Esta especie no mostró diferencias significativas en el PG promedio entre regímenes de temperatura.
- Los resultados sugieren que las semillas de *L. exaltatus* presentan mayor plasticidad para germinar tanto en regímenes fríos como cálidos, debido a que el PG promedio,

aunque bajo no se vio afectado en ningún régimen probado (4.4 a 7.7%), el régimen de 20-15°C lo favoreció (7.7%).

- Los regímenes de temperaturas al afectar la imbibición afectaron significativamente la composición bioquímica de las semillas.
- Para determinar si bajo condiciones naturales las temperaturas tienen un efecto sobre la liberación de la latencia física de las especies estudiadas, se requerirá evaluar diferenciales de temperatura similares a los que se presentan en la región de estudio (de 15 o 20°C entre día/noche), y más tiempo de germinación (30 o 40 días).
- Para una liberación rápida de la latencia física y una germinación homogénea de las semillas de estas especies, se requieren de tratamientos de escarificación.

3.5. Literatura citada

Acosta-Percástegui, J. and D.A. Rodríguez-Trejo. 2005. Factors affecting germination and pregermination treatments of *Lupinus montanus* seeds. *Interciencia*. 30(9): 576-579.

Ahmed, F.A.R., E. Ahdel-Mobdy, A. Rahim, O. Mohamed, A.F., E.A. Volker and C. Lippmann. 1993. The changes of protein patterns during one week of germination of some legume seeds and roots. *Food Chemistry*. 52: 433-437.

Alencar, N.L.M., R.I.E. Gomes-Filho, M.I. Gallão, J.C. Alvarez-Pizarro, J. T. Prisco, and A.B. Oliveira. 2011. Seed reserve composition and mobilization during germination and early seedling establishment of *Cereus jamacaru* D.C. ssp. *jamacaru* (Cactaceae). *An. Acad. Bras. Cienc.* 84(3): 823-832.

Berrios, J. De J., P. Morales, M. Cámara, M.C. Sánchez-Mata. 2010. Carbohydrate composition of raw and extruded pulse flours. *Food Research International*. 43: 531-536.

Bewley, J.D. 2001. Seed germination and reserve mobilization. *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group / www.els.net.

Bewley, J.D. and Black, M. 1982. *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination*. Berlin, Springer-Verlag. 375 p.

- Bewley, J. D., K. J. Bradford, H. W. M. Hilhorst, and H. Nonogaki. 2013. *Seeds: Physiology and Dormancy*. 3rd edition. Springer New York. 392 pp.
- Buckeridge, M. S., I. S. Hutcheon, 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.
- Campos-Vega, R., G. Laorca-Piña, and B. Dave-Oomanh. 2010. Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Research International*. 43(2): 461-482.
- De Lima, C.M.R., F. Borghetti, and M. Valle, S. 1997. Temperature and germination of the activity *Enterolobium contortisiliquum*. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 9(2): 97-102.
- Debeaujon, I., K. M. Leon-Kloosterziel, and M. Koornneef. 2000. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 22: 403-4013.
- Dueñas, M., T. Hernández, I. Estrella, D. Fernández. 2009. Germination as process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). *Food Chemistry*. 117: 599-607.
- Elliot, C.A., D. G. Fischer and C. J. Le Roy. 2011. Germination of three native *Lupinus* species in response to temperature. *Northwest Sci*. 85(2): 403-410.
- Goggin, D. E., S. B. Powles, P. E. Toorop and K. J. Steadman. 2011. Dark-mediated dormancy activity in stratified *Lolium rigidum* seeds is associated with higher activities of cell wall-modifying enzymes and an apparent increase in gibberellin sensitivity. *J. Plant Physiol*. 168: 527-533.
- Hazebroek, J. P. and Metzger, J. D. 1990. Environmental control of seed germination in *Thlaspi arvense* (*Cruciferae*). *American Journal of Botany*. 77(7): 945–953.
- Kuo, Y.H., P. Rozan, F. Lambiend, J. Frias, and C. Vidal-Valverde. 2004. Effects of different germination conditions on the context of protein and no-protein amino acids of comercial Legumes. *Food Chemistry*. 86: 537-545.

Lewis, G., B. Schrire, B. MacKinder, and M. Lock. 2005. Legumes of de World. *Edinburgh Journal of Botany*. 62(3): 195-199.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Mackay, W.A., T.D. Davis, and D. Sankhla. 2001. Influence of scarification and activity on seed germination of *Lupinus arboreus*. *Seed science and technology*. 29 (3): 543-548.

Martínez, J.M., D.A. Rodríguez-Trejo, E. Guizar-Nolazco, and R. Bonilla-Beas. 2008. Natural and artificial scarification of *Lupinus bilineatus* Benth. *Seeds. Rev Chapingo*. 14(4): 73-79.

Moreno, E.M. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. 3 eds. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F. 393 pp.

Muzquiz, M., C. Rey and C. Cuadrado. 1992. Effect of germination on the oligosaccharide content of lupin species. *Journal of Chromatography*. 607:349-325.

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

Olczak. M., E. Niziol, W. Widlak, and B. Morawieka. 1992. The activity of acid phosphatase and the level of storage proteins during the early stages of germination of *Lupinus luteus* and *Lupinus angustifolius* L. seeds. *Acta Societatis Botanicurum Poloniae*. 61(2): 177-185.

Olmedilla, A.B., R. Ferré R., C. Asensio, V. and M. Martín P. 2010. Role of pulses in present-day diet. *Actividad Dietetica*. 14(2): 72-76.

Pablo-Pérez, M., L.C. Lagunes-Espinoza, J. López-Upton, E. M. Aranda-Ibañez y J. Ramos-Juárez. 2015. Composición química de especies silvestres del género *Lupinus* del estado de Puebla México. *Rev. Fitotecnia Mexicana*. 38(1): 49-55.

Ribeiro, R.C.R., B. França, D., C. R. Pelacani. 2012. Mobilization of reserves and germination of seeds of *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae – Papilionoideae) under different osmotic potentials. *Revista Brasileira de Sementes*. 34(4): 580 – 588.

Rosental, L., H. Nonogaki, and A. Fait. 2013. Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research*. 24: 1-15.

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

Satyanarayana, B., P. Subhashini, D. and A. Arundhati. 2011. Biochemical changes during seed germination of *Sterculia urens* Roxb. *Not sct Biol*. 3(3): 105-108.

Servicio Meteorológico Nacional. SMN. 2016. <http://smn.cna.gob.mx/es/informacion-climatologica-ver-estado?estado=pue> (Consultado 23 Julio 2016).

Smykal, P., V. Vernoud, M. W. Blair, A. Soukup, and R. D. Thompson. 2014. The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science* 5(351): 1-19.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol Chem* 195: 19-23.

Suda C. N. K. and J. F. Giorgini. 2000. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 12(3): 226-245.

Sussulini, A., J. S. García, M. F. Mesko, D. P. Moraes, E. M. M. Flores, C. A. Pérez, M. A. Z. Arruda. 2007. Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis. *Microchim Acta*. 158: 173-180.

Toh, S., A. Imamura, A. Watanabe, K. Nakabayashi, M. Okamoto, Y. Jikumaru, A. Hanada, Y. Aso, K. Ishiyama, N. Tamura, S. Luchi, M. Kobayashi, S. Yamaguchi, Y. Kamiya, E. Nambara, and N. Kawakami. 2008. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol*. 146: 1368–1385.

Tonguc, M., R. Elkoyunu, S. Erbas, and Y. Karakurt. 2012. Changes in reserve composition during germination and initial seedling development of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Turk J. Biol. 32: 107-112.

Van Ascheen, 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.

Yemm, E. W. and A. J. Cooking. 1995. The estimation of carbohydrates in plant extracts by Anthrone. Biochemical Journal 57(3): 508-5

CAPITULO IV

EFEECTO DE TRATAMIENTOS PRE-GERMINATIVOS SOBRE EL PORCENTAJE, TASA DE GERMINACIÓN Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA EN SEMILLAS DE *Lupinus* spp.

4.1. Introducción

Las semillas son órganos excelentes de dispersión y han surgido en el curso de la evolución de las plantas (Satyanarayana *et al.*, 2011). Muchas semillas de diferentes especies presentan latencia física, que es causada por la testa, la cual impide la permeabilidad del agua hacia el embrión (Baskin, 2003) debido a la presencia de una o más capas de células de empalizada (Baskin y Baskin, 2004). Muchas especies de la familia *Fabaceae*, como son las semillas de *Lupinus* spp., exhiben este tipo de latencia (Ali *et al.*, 2011).

Existen diferentes métodos para el rompimiento de la latencia física en semillas duras, generalmente clasificados en físicos (escarificación mecánica, alternancias y choques de temperaturas, entre otros), químicos (escarificación ácida, remojo en soluciones alcalinas,) y biológicos (empleo de enzimas, hongos, etc.), estos aceleran la germinación porque permiten la permeabilidad del agua y el intercambio de gases, a causa del desgaste o la fractura de la testa (Qihe *et al.*, 2006). Tratamientos con temperaturas a 150°C simulando las condiciones de incendios rompen la latencia física incrementando el porcentaje de germinación a un 92% en semillas de *Lupinus exaltatus* del estado de Jalisco, en zonas propensas a incendios (Zuluaga-Aguilar *et al.*, 2011). La alternancia de temperaturas combinadas con tratamientos pre-germinativos incrementaron la germinación de *Lupinus* spp. (Elliot *et al.*, 2011). La escarificación con ácido sulfúrico durante 15 minutos, incrementa la germinación a un 65% en semillas de *L. montanus*, sin embargo aunque es efectivo la aplicación de este ácido puede causar daños al embrión (Hernández-Ferretiz *et al.*, 2008).

La ruptura de latencia al permitir la entrada de agua y gases al embrión, reactiva el metabolismo de los compuestos de reservas, hidrolizando o sintetizando nuevos compuestos químicos (Bewley *et al.*, 2013). Cambios en los compuestos de reserva se han observado durante la liberación de la latencia vía estratificación en semillas de *Cyclocarya paliurus*. En esta especie el almidón se reduce 45%, la proteína cruda 46%, los lípidos 11% pero los azúcares solubles se incrementan en un 101.5% (Shen-zou y Jia-yuan, 2007). En semillas de

Oryza sativa un tratamiento hidrotérmico, a 50°C durante 15 min, no solo incrementó el porcentaje de germinación sino también la tasa de respiración y la actividad de α -amilasa (Tung y Serrano, 2011). La movilización de las reservas de las semillas durante la primera fase de la germinación es un proceso esencial para el desarrollo del embrión y la posterior formación de las plántulas (Satyanarayana *et al.*, 2011). Existen pocos estudios que documenten el efecto de tratamientos de escarificación sobre la composición bioquímica de semillas de *Lupinus* durante la liberación de latencia y germinación que permitan una mejor comprensión del efecto de los mismos sobre las reservas de la semilla. Por ello, los objetivos del presente trabajo fueron a) evaluar siete tratamientos de escarificación sobre el porcentaje y tasa de germinación de semillas de *Lupinus* spp. b) determinar en semillas los contenidos de proteína, azúcares solubles totales, azúcares reductores, aminoácidos libres, polifenoles totales y ácido absícico durante la germinación después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos.

4.2. Materiales y Métodos

Material biológico

Se utilizaron semillas maduras de *Lupinus campestris*, *Lupinus exaltatus* y *Lupinus montanus* recolectadas en la Región de los Valles de Serdán y Libres, Puebla, México durante los meses de Septiembre a Noviembre 2014. En esta región la temperatura promedio es de 22°C con una precipitación anual de 731mm. El beneficio de las semillas se realizó en el Laboratorio Forestal del Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Las semillas fueron colocadas en bolsas de papel y se enviaron al Laboratorio de Fisiología Vegetal del Campus Tabasco, en donde se seleccionaron las semillas sanas y se almacenaron a 4°C para su posterior tratamiento y análisis.

Desinfección de la semilla

Las semillas de las tres especies en estudio fueron separadas en grupos de 50 semillas por triplicado, y desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2% por tres min. Posteriormente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, previo a la siembra (el tratamiento con ácido sulfúrico fue el único que no se desinfectó).

Tratamientos pre-germinativos

Lotes triplicados de 50 semillas de cada especie, previamente desinfectadas, fueron puestos a germinar a una temperatura de 20°C día/ 15°C oscuridad, en cajas petri de plástico entre papel absorbente estéril, en cámara de crecimiento (Thermo Scientific modelo 818) con fotoperiodo de 12h luz/12h oscuridad (aproximadamente 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca fluorescente). Durante el tiempo de germinación las semillas fueron regadas diariamente con agua destilada estéril a temperatura ambiente. Se evaluó el porcentaje de germinación (PG) y la tasa de germinación (TG) a los 3, 5, 10 y 15 días después de siembra (dds). Los tratamientos pre-germinativos fueron:

TPG1) Inmersión de las semillas en ácido sulfúrico al 98% (Fermont) durante 15 min, transcurrido el tiempo fueron retiradas del ácido, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, finalmente se pusieron a germinar.

TPG2) Inmersión en arena estéril con agua destilada a 80°C durante 5 min, transcurrido el tiempo se dejaron enfriar a temperatura ambiente, las semillas fueron enjuagadas con agua estéril y se procedió a sembrar.

TPG3) Las semillas fueron cubiertas con arena estéril húmeda, se pusieron a incubar a 35°C en una cámara de crecimiento durante 8 h, posteriormente se cambió la temperatura a 25°C y se dejaron durante 16 h, finalmente las semillas fueron retiradas de la arena y se sembraron en cajas petri.

TPG4) Las semillas fueron cubiertas con arena estéril caliente a 80°C durante 7 min, posteriormente fueron puestas a enfriar a temperatura ambiente y enjuagadas con agua estéril.

TPG5) Secado de las semillas a 150°C en arena estéril durante 1 min, finalmente se enjuagaron y fueron sembradas.

TPG6) Las semillas fueron cubiertas con arena estéril húmeda a 80°C durante 1 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se sembraron.

TPG7) Inmersión en agua 80°C 1 min.

Testigo) Semillas sin tratamiento pre-germinativo.

Curva de imbibición

Lotes triplicados de 10 semillas por especie después de aplicar los tratamientos pregerminativos, fueron pesados y colocados en cajas petri con 10 mL de agua estéril. Las cajas fueron colocadas en una cámara de crecimiento (Thermo Scientific modelo 818) con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad, a una temperatura de 20-15°C. Las semillas fueron pesadas a las 8, 24, 36, 48, 96 y 120 h. Finalmente se realizó una curva de imbibición tomando en cuenta la ganancia de peso en las semillas (mg) y el tiempo de imbibición (h).

Evaluación del porcentaje y tasa de germinación

Las semillas fueron consideradas germinadas cuando la radícula alcanzó una longitud > 2mm. El conteo se realizó diariamente. Al final de 15 días todas las semillas remanentes fueron caracterizadas como no germinadas (contabilizando semillas duras y dañadas). Se calculó el porcentaje y la tasa de germinación con las siguientes ecuaciones:

Porcentaje de germinación (PG):

$$PG = \frac{NTSG \times 100}{NTSS},$$

donde: NTSG = Número de semillas germinadas. NTSS = Número total de semillas sembradas.

Tasa de germinación (TG), definida como la medida del número de semillas germinadas en relación con el tiempo de germinación; se determinó con la siguiente formula: $TG = \sum (ni)/t$, dónde: ni = número de semillas germinadas en día i. t = tiempo de germinación desde la siembra hasta la germinación de la última semilla.

4.2.1. Análisis bioquímicos

Obtención de harina

En cada fecha (0, 3, 5, 10, y 15 dds) después del inicio del tratamiento, las semillas germinadas y no germinadas fueron usadas para el análisis bioquímico. Cumplido el tiempo de germinación fueron puestas a secar en una estufa de aire forzado (SHEL LAB Modelo: CE3F) a 50°C durante 48 h (Tonguc *et al.*, 2012), posteriormente fueron molidas en mortero y la harina resultante se conservó a 4°C hasta su uso.

Desengrasado de la muestra

La harina fue desengrasada por 2 h con hexano al 95% en una relación harina/hexano 1:10 (p/v) en agitación constante a 280 rpm a 4°C. La mezcla fue centrifugada a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se decantó y el precipitado resultante libre de grasa se dejó secar a temperatura ambiente hasta la evaporación total del solvente y finalmente se conservaron hasta antes de su uso a 4°C.

Extracto crudo de proteína soluble

Se pesaron 100 mg de muestras previamente desengrasadas, se les agregaron 2.5 mL de la solución tris-HCL 0.3 mol L⁻¹ pH 8.0 y 0.01 mol L⁻¹ de β-mercaptoetanol, se mezclaron en vortex y se dejaron incubar durante 1 h con agitación cada 10 min. Después fueron centrifugadas a temperatura ambiente por 20 min a 1100 xg, el sobrenadante fue colectado en un tubo de ensaye (Sussulini *et al.*, 2007).

Determinación de proteína

El contenido de proteína total fue estimado por el método de Lowry *et al.* (1951). Del concentrado de proteína se realizó una dilución 1:4 (250 µL del concentrado más 750 µL de agua destilada), de esta dilución se tomaron 0.02 mL, se le agregaron 0.7 mL de solución Lowry (A1). Las muestras se dejaron incubar en oscuridad 20 min, transcurrido el tiempo se agregaron 0.1 mL del reactivo de Folin Ciocalteu 2N (SIGMA Código F9252) y se dejaron incubar 30 min en oscuridad. Para la curva de calibración se preparó una solución estándar de Albumina sérica bovina (BSA), Sigma código A21539. Se pesaron 10 mg de BSA y se diluyeron en 10 mL de agua (concentración de 1mg mL⁻¹). A partir de esta solución se preparó una curva de calibración de concentraciones conocidas entre 0 y 0.2 mg mL⁻¹ (Cuadro A1). Cada análisis se realizó por triplicado, midiéndose la absorbancia a 750 nm. Los resultados, se expresaron como mg g⁻¹ de PS.

Extracción de azúcares

Para la extracción se pesaron por triplicado 200 mg de muestra previamente desengrasada y seca, de cada especie y por tratamiento, en tubos de ensaye de 20 mL de capacidad. A cada muestra se agregaron 3 mL de etanol absoluto y se colocaron a baño María a 70° C por 5 min. Al término el sobrenadante (extracto) fue recuperado en un matraz Erlenmeyer de 50

mL. Este proceso se repitió cuatro veces. El extracto fue secado en una estufa de aire forzado a 70 °C hasta evaporación total; y entonces resuspendido en 1 mL de agua destilada. El extracto fue conservado a -20 °C hasta su uso.

Determinación de Azúcares Solubles Totales

La determinación de azúcares solubles totales se realizó con el método de Somogy (1973). Se preparó una dilución 1:20 (25 μL del extracto más 475 μL de agua destilada) de las muestras, de esta dilución se tomaron 100 μL más 300 μL de agua destilada y 3mL de Antrona. Los contenidos se mezclaron en vortex y se dejaron enfriar en hielo durante 5 min. Posteriormente se transfirieron a baño María a 100 °C y se dejaron incubar durante 10 min, después se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Para la curva de calibración se pesaron 12.5 mg de glucosa y se diluyeron en 5 mL de agua quedando a una concentración de 2.5 mg mL^{-1} , de aquí se tomaron concentraciones conocidas entre 0 y 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para la curva de calibración (Cuadro A2). La absorbancia se leyó 625 nm en un espectrómetro (Thermo Scientific, Multiskan go). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Determinación de azúcares reductores

Para la determinación de azúcares reductores se utilizó el mismo extracto de azúcares totales. Se tomaron 0.5 mL de la muestra y se adicionaron 1.5 mL de agua destilada, 1 mL de la solución alcalina de tartrato de cobre. Las muestras se colocaron en baño María a 100°C durante 10 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se agregó 1mL de reactivo arsenomolibdico. Finalmente se agregaron 6 mL de agua destilada. Para la curva de calibración se preparó una solución stock de 0.1 mg mL^{-1} de glucosa [se pesaron 100 mg de glucosa y se disolvieron en 100 mL, de esta solución se tomaron 10mL y se disolvieron en 100 mL]. A partir de esta solución se preparó la curva de calibración a concentraciones entre 0 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Cuadro A3). La absorbancia se leyó 620 nm en un espectrómetro (Thermo Scientific, Multiskan go). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Determinación de aminoácidos libres

La determinación de aminoácidos libres se realizó por el método de Yemm y Cocking (1995). Se tomaron 0.1mL de la muestra y se completó el volumen a 1mL con agua destilada, se agregó 1 mL del reactivo ninhidrina se mezclaron las muestras en vortex y se colocaron

en baño María a 100°C durante 15 min, transcurrido el tiempo fueron colocados en agua fría, finalmente se les añadió 5mL de la solución diluyente solvente (Etanol 80%), se dejaron incubar a temperatura ambiente 10 min.

Para la curva de calibración se preparó una solución Stock de Leucina a 0.1 mg mL⁻¹ [se pesaron 50 mg de Leucina y se disolvieron en 50 mL de agua, de esta solución se tomaron 10 mL y se disolvieron en 100 mL de agua], realizando a partir de ella soluciones estándar de concentraciones de 0 a 1 mg mL⁻¹ (Cuadro A4). La absorbancia se leyó a 570 nm en un espectrómetro (Thermo Scientific, Multiskan go). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Extracción de polifenoles totales

De la muestra previamente desengrasada se pesaron 250 mg, por triplicado, en tubos eppendorf de 1.5 mL. La extracción se realizó por agitación (1 minuto en vortex) con 1 mL de metanol al 80%, las muestras fueron colocadas en baño María a 50°C por 15 min y centrifugadas a 10,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue recuperado en otro tubo, el residuo fue nuevamente lavado y agitado con 0.5 ml de metanol al 100%. Ambos sobrenadantes fueron recuperados y el volumen se ajustó a 1.5 mL con agua destilada y se almacenó a -20°C protegido de la luz.

Cuantificación de polifenoles totales

Para la cuantificación se tomaron 0.2 mL del extracto obtenido y se les agregaron 1.5 mL agua destilada y 0.1 mL del reactivo Folin-Denis al 50%, posteriormente se agregaron 0.2 mL de carbonato de sodio anhidro al 15% (Na₂CO₃). Los contenidos fueron mezclados en vortex y se dejaron incubar 30 min en la oscuridad. Para la curva de calibración se preparó una solución stock de 100µg mL⁻¹ de ácido gálico [se pesaron 2.5 mg de ácido gálico y se disolvieron en 25 mL agua]. Realizando a partir de ella soluciones estándar de concentraciones 0 a 100 µg mL⁻¹ (Cuadro A5). La absorbancia se leyó 765 nm en un espectrómetro (Thermo Scientific, Multiskan go). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Extracción de ABA

La concentración de ácido absícico se determinó de acuerdo a Khadri *et al.* (2006) y Kishwar *et al.* (2011) El análisis se realizó en semillas sin tratamiento, en semillas inmediatamente después de la aplicación del tratamiento de agua a 80°C por 1 min, y en semillas con tratamiento más 30 dds. De estas muestras, se tomaron 0.5 g de material fresco, se maceró con 5 ml de solvente de extracción (metanol 80% y 10 mg L⁻¹ de butilatohidroxitolueno) y se incubaron a 4°C durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se colectó. Se realizaron sucesivamente 2 extracciones más del precipitado con 1 mL de solvente de extracción. Los 3 sobrenadantes se juntaron y se les agregó 30 mg de polivinil-polipirrolidona (Polyvinyl-polypyrrolidone, PVPP) para eliminar los pigmentos vegetales y otros compuestos no polares que podrían interferir con el inmunoensayo. El sólido obtenido se resuspendió en 0.5 mL de tampón Tris-HCl 25 mM pH 7.5, que contenía NaCl 100 mM y cloruro de magnesio 1 mM.

Cuantificación de ABA

La cuantificación del ácido absícico (ABA) se realizó mediante inmunoensayo (ELISA), utilizando el kit de detección PGR-1 específico para esta hormona (Sigma PGR1-1KT). Alícuotas de 0.1 mL de muestra y 0.1 mL de solución trazadora se añadieron a cada pocillo y se incubaron a 4°C durante 3 h. En este tiempo el ABA de la muestra compete con la molécula trazadora, que lleva enlazada la enzima fosfatasa alcalina, por unirse a los anticuerpos monoclonales específicos para ABA fijados a la placa ELISA. Transcurrido este tiempo, se realizaron dos lavados con 0.1 mL de solución PBS Tween de lavado, se añadieron 0.2 ml de solución sustrato (paranitrofenil fosfato), y las placas se incubaron a 37°C durante 60 min, para que se produzca la reacción enzimática. Finalmente se realizó la lectura de absorbancia a 405 nm con un lector de placas de ELISA. La cuantificación se realizó en base a una curva patrón de ABA (0-1000 pmol mL⁻¹).

Análisis estadístico

Los datos de PG fueron transformados a la raíz cuadrada de arcoseno (Elliot *et al.*, 2011) para tener una distribución normal aproximada de los porcentajes y junto con los de tasa de germinación y análisis bioquímicos, fueron sometidos, por especie, a un análisis de varianza, bajo un diseño completamente al azar en arreglo factorial. El primer factor fue el tratamiento

con ocho niveles (Tratamientos pregerminativos) y el segundo factor fue el tiempo con cuatro niveles (0, 3, 5, 10, 15 dds) y sus interacciones (Tratamiento*Tiempo). Pruebas de medias de Tukey se aplicaron para distinguir diferencias entre tratamientos utilizando el programa estadístico SAS (SAS, 2010).

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1 Curvas de imbibición

La aplicación de tratamientos pre-germinativos afectó significativamente la imbibición de las semillas de las tres especies estudiadas. En la interacción tratamiento*horas de imbibición se observó efecto altamente significativo solo en *L. exaltatus* (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Análisis de varianza del efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la imbibición (ganancia de peso, mg) de semillas de *Lupinus*.

Factor de variación	GL	<i>L. exaltatus</i>	<i>L. campestris</i>	<i>L. montanus</i>
		Cuadrado Medio		
Tratamiento (T)	6	26888.05***	2107.5***	3401.15***
Tiempo (h)	6	2560.15***	1813.43***	2064.78***
T*h	36	844.23**	316.94ns	197.56ns
Error	98	358.47	252.92	226.48

ns: no significativo. *(p <0.05) ;**(p<0.01) ;***(p< 0.0001); GL= grados de libertad

En la Figura 4.1 se muestra el efecto de los tratamientos pre-germinativos sobre la imbibición de las tres especies. En *L. exaltatus* el mejor tratamiento pre-germinativo, donde se observó mayor ganancia de peso, fue el PG5 (Arena 150°C 1 min), indicando que este tratamiento causó el reblandecimiento o ruptura de la testa facilitando así la entrada de agua. El segundo mejor tratamiento fue PG1 (H₂SO₄ al 98% 15 min). No se encontraron diferencias significativas en los otros tratamientos respecto al testigo. En las especies *L. campestris* y *L. montanus* se observó un efecto similar. En ambas especies el mejor tratamiento pre-germinativo fue el PG1. En *L. campestris*, los tratamientos de calor seco y húmedo no fueron diferentes al testigo. En *L. montanus* los tratamientos con calor húmedo, PG2 y PG6 (Arena 80°C 1 min y H₂O 80°C 1 min) fueron los que en segundo término imbibieron más respecto al PG1. En esta especie, los tratamientos con calor seco 80°C por 1 min y alternancia de temperaturas 35-25°C en arena húmeda (PG3 y PG4, respectivamente) no superaron al testigo.

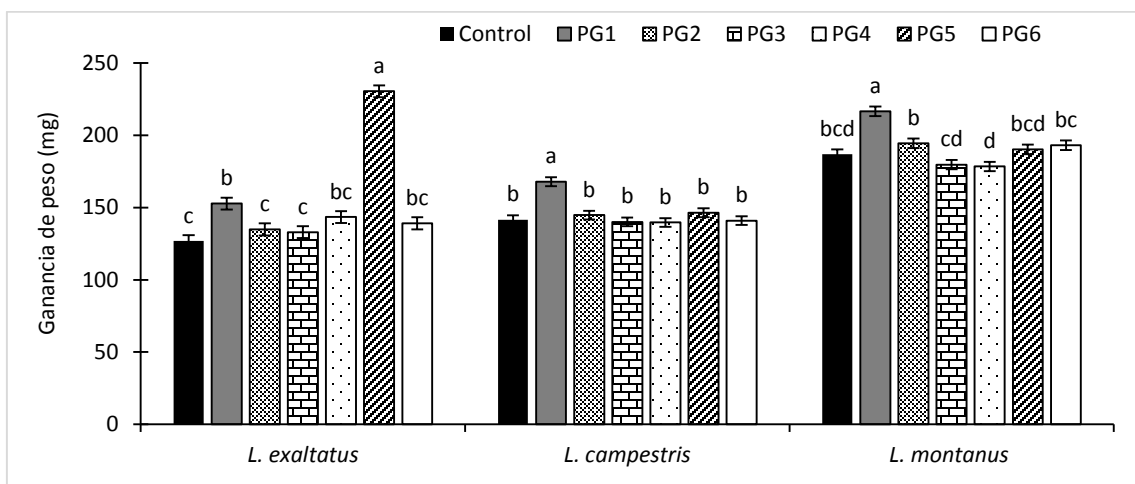


Figura 4.1. Ganancia de peso en semillas (mg^{-1}) de *Lupinus* sp. después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos. Testigo: semillas sin tratamiento; PG1: H_2SO_4 15 min; PG2: H_2O 80°C 5 min; PG3: Arena húmeda 35°C 8h seguido de 16h 25°; PG4: Arena seca 80°C 7 min; PG5: Arena 150°C 1 min; PG6: Arena húmeda 80°C 1 min; PG7: Agua 80°C 1 min.

Estos resultados indican que la aplicación de algunos tratamientos pre-germinativos favorece el proceso de imbibición, por lo tanto se esperaría que los tratamientos pre-germinativos PG1, PG2, PG5 y PG6 logren incrementar el PG en estas especies.

4.3.2. Efecto de los tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje y tasa de germinación (PG y TG)

El análisis de varianza del PG y TG se muestra en el Cuadro 4.2. El PG y TG de las tres especies de *Lupinus* fueron afectadas significativamente por la aplicación de los tratamientos pre-germinativos. Esto indica que la aplicación de tratamientos pre-germinativos debilita la testa permitiendo dar inicio al proceso de imbibición y posteriormente la germinación.

El PG de semillas de *Lupinus* después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos se muestra en la Figura 4.2. En *L. exaltatus* (Figura 4.2 a) los tratamientos PG1, PG2, PG6 y PG7, superaron el del testigo (7%). El tratamiento de H_2O a 80°C 1 min (PG7) fue el más efectivo (41%), seguido del tratamiento H_2SO_4 98% 15 min (34%), superando con un 33 y 27% al testigo, respectivamente. Para el tratamiento PG7, el máximo incremento de la germinación se observó en los días 10 y 15, caso contrario se observó en el PG1 donde la germinación inició rápidamente desde los primeros días después de siembra (dds).

Cuadro 4.2. Análisis de varianza del porcentaje y tasa de germinación (semillas día⁻¹) en tres especies de *Lupinus* después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos.

Factor de variación	GL	<i>L. exaltatus</i>		<i>L. campestris</i>		<i>L. montanus</i>	
		PG	TG	PG	TG	PG	TG
		Cuadrado Medio					
Tratamiento (T)	7	0.65***	7.54***	0.46***	8.7***	0.38***	7.4***
Días (D)	3	0.23***	102.1***	0.75***	0.46*	0.3***	0.91**
T*D	21	0.02***	0.66***	0.09***	1.66***	0.03**	0.8***
Error	120	0.01	0.11	0.01	0.14	0.01	0.21

*(p < 0.05) ; ** (p < 0.01) ; *** (p < 0.0001); GL= grados de libertad

El tratamiento PG5 (150°C 1 min) inhibió la germinación en esta especie. Un efecto similar se observó en el PG de las semillas de *L. campestris* (Figura 4.2 b), donde los tratamientos que lograron superar al testigo fueron PG1, PG2, PG5, PG6 y PG7. Siendo el mejor tratamiento el de H₂O 80°C 1 min (PG7) incrementando el PG a un 69%, seguido del tratamiento arena húmeda 80°C 1 min con un PG de 49%. El máximo incremento de la germinación en estos tratamientos se alcanzó en 10 dds. Para la especie de *L. montanus* (Figura 4.3), los tratamientos que lograron superar al testigo fueron H₂SO₄ 98% 15 min (PG1), arena húmeda 80°C 1 min (PG6) y H₂O 80°C 1 min (PG7) entre los cuales no se observaron diferencias significativas.

En general, la especie donde se observó mayor PG fue en *L. campestris* (PG7 = 69%), seguida de *L. exaltatus* (PG7 = 41%) y por último la especie de *L. montanus* (PG7 = 36%). Las tres especies respondieron favorablemente al tratamiento de H₂O 80°C 1min. La eficiencia de este tratamiento también ha sido observada en semillas de *Lupinus lepidus* (Elliot *et al.*, 2011) y en semillas de *Leucaena cv.* Cunningham expuestas 2 min al agua 80°C donde se alcanzó un PG de 55% (Sánchez *et al.*, 2005). De acuerdo con Tiryaki y Topu (2014) la eficiencia de los tratamientos térmicos, como cambios bruscos de temperatura, provocan grietas en la testa de la semilla, debido a que las células que la conforman sufren una expansión en el agua caliente y posterior contracción por efecto de la disminución de la temperatura.

El tratamiento donde también se observaron PG altos en las tres especies fue con ácido sulfúrico. Este tratamiento ha sido empleado en semillas de *Lupinus varius* alcanzando un 80% de germinación con 12 h de exposición (Karaguzel *et al.*, 2004), en *L. campestris* con una exposición de 90 min se ha alcanzado un PG de 50% (Gutiérrez-Nava *et al.*, 2010) y en *L. montanus* con una exposición de 15 min un PG de 75% (Hernández-Ferretiz *et al.*, 2008).

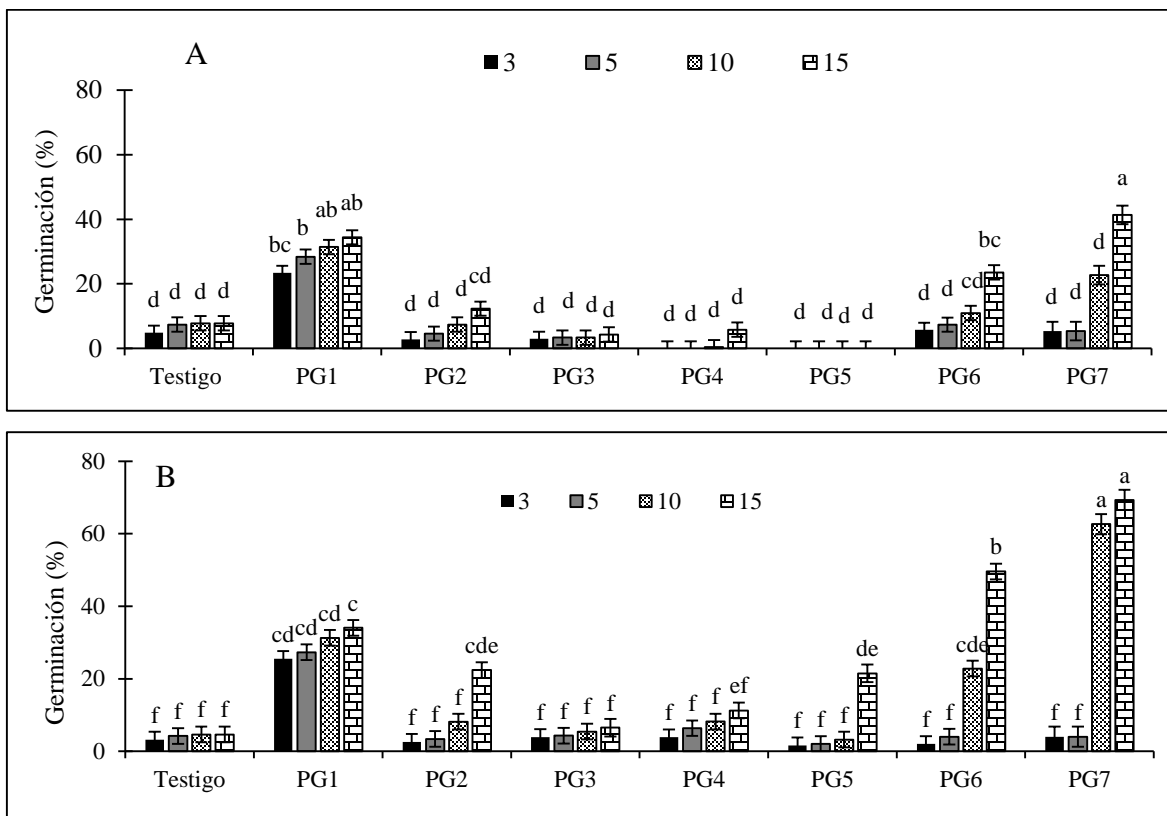


Figura 4.2. Efecto de la aplicación de tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje de germinación en semillas de *L. exaltatus* (A), *L. campestris* (B). **Testigo:** semillas sin tratamiento; **PG1:** H₂SO₄ 15 min; **PG2:** H₂O 80°C 5 min; **PG3:** Arena húmeda 35°C 8h seguido de 16h 25°; **PG4:** Arena seca 80°C 7 min; **PG5:** Arena 150°C 1 min; **PG6:** Arena húmeda 80°C 1 min; **PG7:** Agua 80°C 1 min. Letras diferentes por tratamiento, son significativamente diferente (p<0.05).

Los PG obtenidos en este estudio con el tratamiento ácido fueron bajos comparados con otras investigaciones, esto podría estar relacionado con la variación intraespecífica para el PG, que ha sido reportada en este género (Elliot *et al.*, 2011). Sin embargo aunque los tratamientos que emplean ácido sulfúrico incrementan el porcentaje de germinación de 50 a 100%, es un método que implica riesgos y altos costos (Karaguzel *et al.*, 2004; Hernández-Ferretiz *et al.*, 2008; Gutiérrez-Nava *et al.*, 2010).

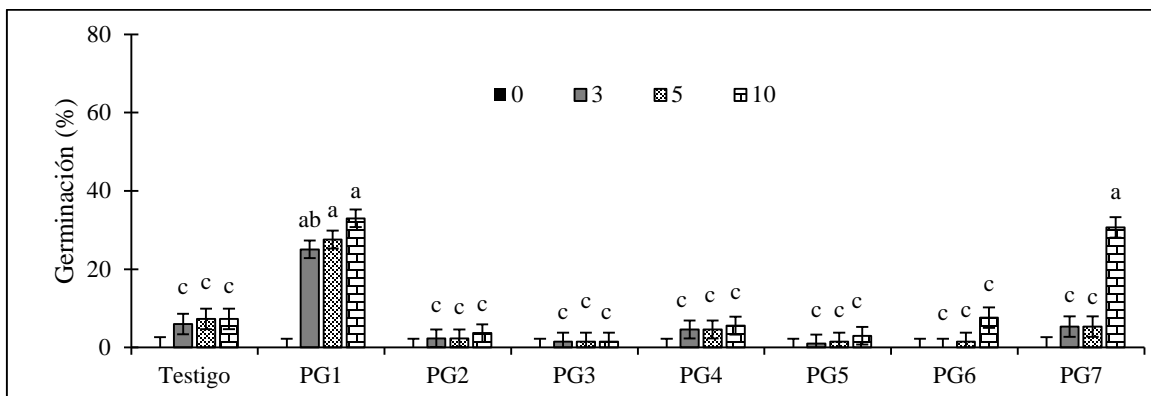


Figura 4.3. Efecto de la aplicación de tratamientos pre-germinativos sobre el porcentaje de germinación en semillas de *L. montanus*. **Testigo:** semillas sin tratamiento; **PG1:** H₂SO₄ 15 min; **PG2:** H₂O 80°C 5 min; **PG3:** Arena húmeda 35°C 8h seguido de 16h 25°; **PG4:** Arena seca 80°C 7 min; **PG5:** Arena 150°C 1 min; **PG6:** Arena húmeda 80°C 1 min; **PG7:** Agua 80°C 1 min. Letras diferentes por tratamiento, son significativamente diferentes (p<0.05).

De acuerdo a los resultados de imbibición en semillas de *L. exaltatus*, se esperaba un PG alto en el tratamiento arena seca 150°C (PG5), sin embargo aunque este tratamiento permitió la entrada de agua al embrión, inhibió la germinación. Inhibición de germinación fue también observado por Robles-Díaz *et al.* (2014), al aplicar tratamientos a base de calor seco (120 y 150°C) en semillas de *Lupinus elegans* y *Lupinus rotundiflorus* colectadas en el estado de Jalisco. En contraste este tratamiento también fue evaluado por Zuloaga-Aguilar *et al.* (2011) en semillas de *L. exaltatus* colectadas en el estado de Jalisco, en zonas propensas a incendios forestales, alcanzando un 93% de germinación. El efecto negativo de este tratamiento en las especies en estudio, podría deberse a la imbibición rápida de las semillas a través de las grietas causadas por el tratamiento lo que ocasionó que las paredes celulares pasen a una fase cristalina líquida y se convierten temporalmente permeables, lo que puede resultar en una fuga excesiva de compuestos citoplasmáticos tales como azúcares, aminoácidos y proteínas afectando así la germinación (Schelin *et al.*, 2003; Bewley *et al.*, 2013).

El incremento en el PG de las tres especies después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos respecto al testigo confirma la presencia de latencia física en estas semillas. El efecto de los tratamientos pre-germinativos sobre la TG promedio se observa en la Figura 4.4. En las tres especies, el tratamiento con ácido sulfúrico (PG1) incrementó la TG, seguido de los tratamientos PG6 y PG7 comparados con el testigo.

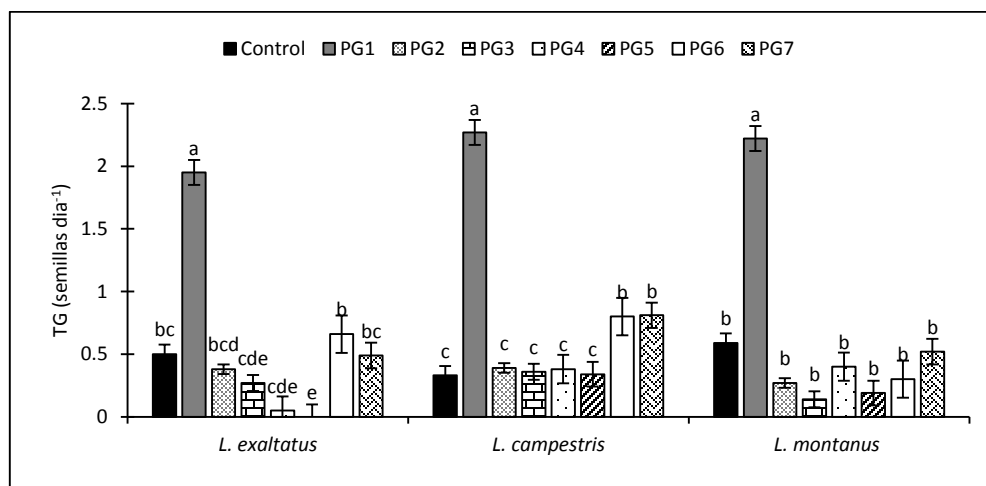


Figura 4.4. Efecto de los tratamientos pre-germinativos sobre la tasa de germinación (TG) de semillas de *Lupinus* sp. Letras diferentes por tratamiento, son significativamente diferente ($p < 0.05$). Testigo: semillas sin tratamiento; PG1: H_2SO_4 15 min; PG2: H_2O 80°C 5 min; PG3: Arena húmeda 35°C 8h seguido de 16h 25°C; PG4: Arena seca 80°C 7 min; PG5: Arena 150°C 1 min; PG6: Arena húmeda 80°C 1 min; PG7: Agua 80°C 1 min.

En general la aplicación de H_2SO_4 incrementa la TG en las tres especies estudiadas, la aplicación de este tratamiento durante 10 min también ha incrementado la TG en semillas *Peltophorum pterocarpum* (fabácea) (Atencio *et al.*, 2003).

4.3.3. Cambios bioquímicos

De acuerdo con el análisis estadístico (Cuadro 4.3), la aplicación de tratamientos pre-germinativos, días después de siembra y la interacción de ambos, presentaron un efecto altamente significativo sobre la concentración de compuestos bioquímicos en las tres especies. Solo en *L. exaltatus*, la variable AST no presentó diferencias significativas entre tratamientos.

La germinación es un proceso complejo en donde el metabolismo de la semillas pasa de un estado quiescente a uno activo, iniciando principalmente por la imbibición y terminando con la protrusión de la radícula, es en este proceso donde ocurre una gran movilización de las reservas de las semillas tales como proteínas, carbohidratos y lípidos (Nonogaki *et al.*, 2010). Por ello, la aplicación de tratamientos que faciliten la imbibición a la tasa requerida para germinar, inducirá cambios en el metabolismo interno de las semillas pretratadas.

Cuadro 4.3. Análisis de varianza del efecto de los tratamientos pre-germinativos y el tiempo de germinación sobre la concentración de proteína, aminoácidos (AA), azúcares reductores (AR), polifenoles totales (PFT) y azúcares solubles totales (AST) en tres especies de *Lupinus*.

Factor de variación	Proteína	AA	AR	PFT	AST
	mg g ⁻¹ PS				
<i>L. exaltatus</i>					
	Cuadrado Medio				
Tratamiento (T)	40636.96***	279.73***	3.23***	1.48***	15642.81ns
Días (D)	78195.96***	708.21***	2.14**	1.47***	104088.03***
T*D	10065.37***	160.22***	2.44***	1.06***	41349.93***
Error	1041.94	41.33	0.39	0.02	9571.25
<i>L. campestris</i>					
Tratamiento (T)	12507.73***	724.75***	5.07***	4.01***	43239.38***
Días (D)	64950.5***	821.67***	13.01***	1.25**	90321.98***
T*D	16559.22***	316.36***	1.76***	1.01***	37073.74***
Error	2231.71	45.62	0.12	0.31	3805.96
<i>L. montanus</i>					
Tratamiento (T)	16143.39***	428.26***	8.4***	1.39***	13572*
Días (D)	75825.34***	593.34***	10.18***	2.17***	118656***
T*D	14827.71***	80.08**	2.68***	0.31***	27170.04***
Error	2146.35	29.41	0.53	0.06	5841.87

ns: no significativo;*(p <0.05) ;**(p<0.01) ;***(p< 0.0001).

4.3.3.1. Proteína Soluble

Los tratamientos pre-germinativos indujeron el reblandecimiento de la testa permitiendo dar inicio a la fase de imbibición y posteriormente la emergencia de la radícula (finalización de la germinación). De acuerdo con la literatura, es en esta fase donde ocurre una gran movilización de reservas, entre ellas las proteínas (Nonogaki *et al.*, 2010; Bewley *et al.*, 2013). Por lo tanto los tratamientos pre-germinativos afectaron significativamente la concentración de proteína debido a que permitieron la imbibición y en porcentajes variados, la germinación en las tres especies (Figura 4.4). En *L. exaltatus* solo el tratamiento de agua 80°C 1 min (PG6) incrementó la concentración de proteína en 13% respecto al testigo. La aplicación de este tratamiento (PG6) no cambió el contenido de proteína de manera significativa entre los días después de siembra. Se observó una disminución en el contenido de proteína a los 3 y 5 dds en los tratamientos PG1 (39 y 47%), PG2 (40 y 48%), PG3 (45%, 5dds), PG4 (34 y 45%) y PG5 (35 y 88%), respecto al testigo, para después incrementar gradualmente. En las muestras del tratamiento testigo la concentración de proteína se

incrementó durante la germinación y no se observaron disminuciones en su concentración, debido probablemente al bajo porcentaje de germinación (<10%).

La disminución en los contenidos de proteína a los 3 y 5 dds, en algunos tratamientos (PG1 al PG5), está relacionada a la TG, ya que en estos tratamientos la TG fue mayor en los primeros días de germinación, lo que sugiere que las reservas proteicas de las semillas fueron degradadas rápidamente. Por el contrario en el tratamiento PG6, la TG fue constante y por esto la concentración de proteína no fue afectada significativamente.

Para el caso de *L. campestris* todos los tratamientos lograron incrementar la concentración de proteína con respecto al testigo siendo el tratamiento PG2 donde se observó mayor concentración promedio de proteína con 321.2 mg g⁻¹ PS. Los mayores incrementos de proteína se observaron a los 5 y 10 dds. Solo en el tratamiento PG3 se observó una disminución de 53% de proteína a los 5 dds, respecto al testigo. En el tratamiento de H₂SO₄ 15 min (PG1) se observó un incremento en la concentración de la proteína a los 3 dds para finalmente disminuir en el día 15. En otra especie, Benítez-Rodríguez *et al.* (2013) observaron el incremento en la concentración de proteína después de la aplicación de H₂SO₄. Esto podría ser debido a que la aplicación de este tratamiento reblandeció la testa y permitió la entrada de agua para posteriormente dar inicio a la movilización de las reservas.

En semillas de *L. montanus* la aplicación de tratamientos pre-germinativos tuvo un efecto significativo sobre la concentración de proteína. El mayor incremento de proteína fue a los 5 dds en los tratamientos PG1 (42%), PG2 (178.6%), PG4 (24%) y PG5 (50%). Al igual que en las otras especies, el tratamiento PG6 logró incrementar la concentración de proteína desde los 3 dds y no se observaron cambios significativos en los días posteriores.

El incremento en la concentración de proteína observado en las tres especies en el tratamiento de agua a 80°C 1 min (PG6), también ha sido reportado en semillas de *Echinochloa crus-galli* durante la liberación de latencia después de una breve exposición a altas temperaturas (46°C) (Di Nola y Taylorson, 1990), sin embargo en semillas de *Cucumis sativus* L. la aplicación de tratamientos que incluyen altas temperaturas (50°C) para la liberación de latencia afecta de manera poco significativa la concentración de proteína soluble (Amritphale *et al.*, 2000). De acuerdo con Di Nola y Taylorson (1990), la exposición de las semillas a altas temperaturas produce cambios metabólicos en la composición de las

proteínas solubles y en las proteínas unidas a las membranas celulares resultando en un incremento comparado con semillas sin tratamiento térmico.

La disminución de la concentración de proteína en los tratamientos PG1, PG2, PG3, PG4 y PG5 a los 3 y 5 dds, observado principalmente en *L. exaltatus*, puede deberse a que durante la fase de imbibición y germinación, las proteínas existentes fueron utilizadas como fuente de nitrógeno (Müntz *et al.*, 2001) y no fueron suficientes para generar un incremento inicial. El posterior incremento puede estar relacionado a síntesis de nuevas proteínas y degradación, que provee aminoácidos y estos se encargan de la síntesis de *novο* proteínas para apoyar el crecimiento de las plántulas (Bewley *et al.*, 2013). La razón por la cual en el tratamiento testigo no se observó una disminución significativa en el contenido de proteína, podría estar relacionada con el PG bajo (<10%), y las reservas proteicas no se movilizaron.

4.3.3.2. Aminoácidos Libres (AA)

El la Figura 4.5 se muestra el efecto de los tratamientos pre-germinativos sobre la concentración de AA. La concentración promedio de aminoácidos en *L. exaltatus* fue de 25.3 mg g⁻¹ PS en el tratamiento PG1 superando en un 44% al testigo. A los 3 dds la concentración de AA fue mayor en tratamiento PG1, posteriormente a los 5 dds la cantidad de AA disminuyó en todos los tratamientos a excepción del testigo, el cual incrementó su concentración hasta los 10 dds. Finalmente a los 15 dds la mayor concentración de AA se observó en el PG1 superando al testigo en un 130%. En todos los tratamientos la concentración de AA disminuyó a los 3 y 5 dds, para después incrementarse a los 15 dds. En semillas de *L. campestris* la concentración de AA promedio aumentó en todos los tratamientos, únicamente los tratamientos PG3 y PG5 no fueron estadísticamente diferentes al testigo. En promedio la concentración de AA disminuyó a los 3 dds y la mayor síntesis se observó a los 10 y 15 dds, esto coincide con los datos obtenidos de PG ya que fue en estas fechas donde la germinación se incrementó.

A los 3 y 5 dds no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, finalmente a los 10 y 15 dds la concentración de AA incrementó en los tratamientos PG1 y PG6, superando al testigo en un 239 y 189%, respectivamente.

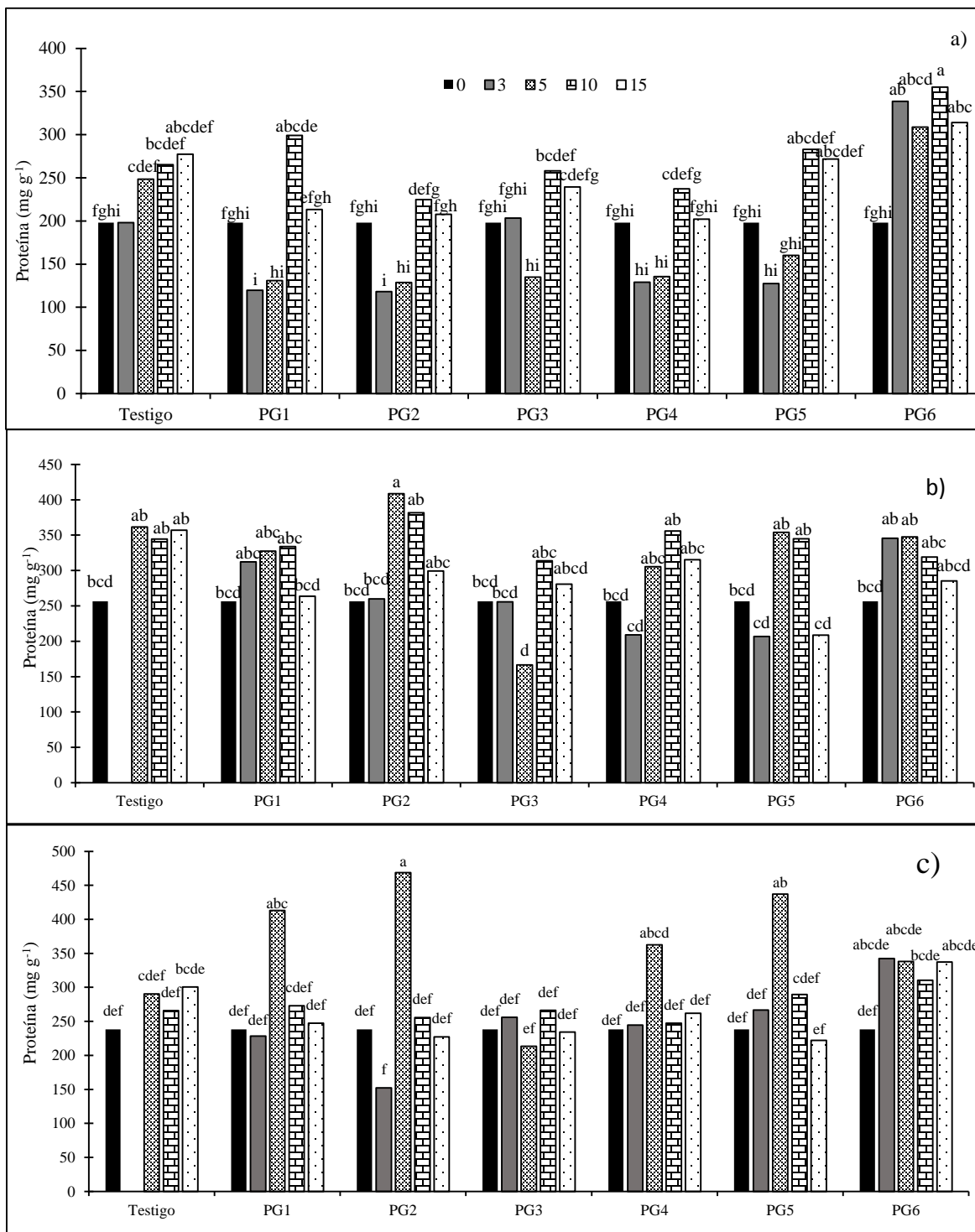


Figura 4.4. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la concentración de proteína soluble (mg g⁻¹ PS) durante la germinación en semillas de *L. exaltatus* (a), *L. campestris* (b) y *L. montanus* (c) **Testigo:** semillas sin tratamiento; **PG1:** H₂SO₄ 15 min; **PG2:** H₂O 80°C 5 min; **PG3:** Arena húmeda 35°C 8h seguido de 16h 25°C; **PG4:** Arena seca 80°C 7 min; **PG5:** Arena 150°C 1 min; **PG6:** Arena húmeda 80°C 1 min.

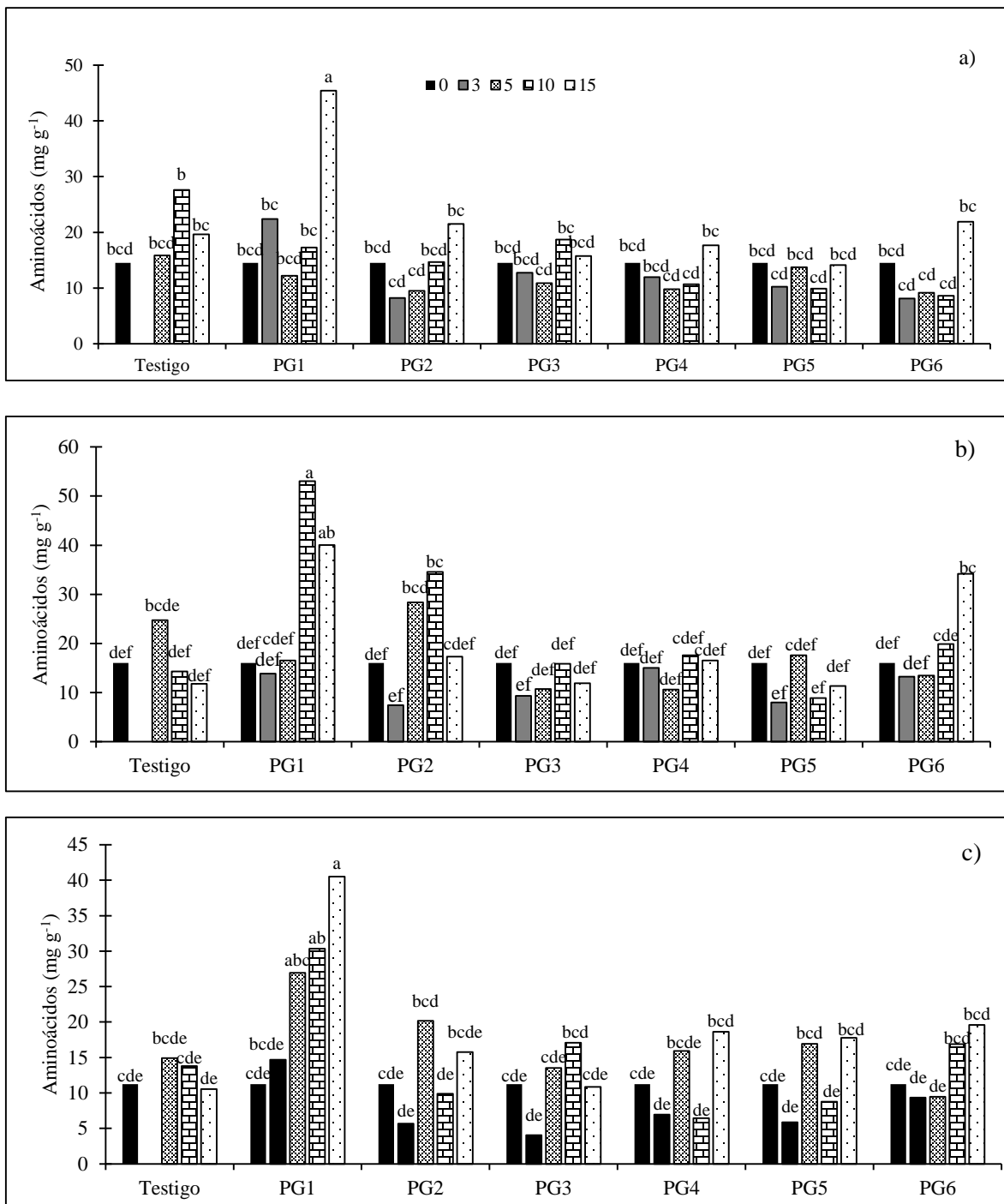


Figura 4.5. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la concentración de aminoácidos (mg g⁻¹ PS) en semillas de *L. exaltatus* (a), *L. campestris* (b) y *L. montanus* (c). **Testigo:** semillas sin tratamiento; **PG1:** H₂SO₄ 15 min; **PG2:** H₂O 80°C 5 min; **PG3:** Arena húmeda 35°C 8h seguido de 16h 25°C; **PG4:** Arena seca 80°C 7 min; **PG5:** Arena 150°C 1 min; **PG6:** Arena húmeda 80°C 1 min.

En semillas de *L. montanus*, la cantidad promedio de aminoácidos en el PG1 superó al testigo en un 145%, no se encontraron diferencias significativas en los otros tratamientos comparados con el testigo. A los 3 dds, el contenido de AA fue afectado en todos los tratamientos a excepción del PG1 el cual fue incrementando gradualmente hasta finalizar el tiempo de germinación, superando al testigo a los 15 dds con 283%. Únicamente el tratamiento PG3 no presentó diferencias significativas respecto al testigo en este tiempo, lo que podría estar relacionado al PG, ya que no fue significativo en este tratamiento.

El aumento en la concentración de AA podría estar relacionado con los resultados de proteína, debido a que en los tratamientos donde la proteína fue alta se observó una disminución en la concentración de los AA y cuando la concentración de proteína fue menor los AA incrementaron. Diversos autores indican que el incremento en la concentración de AA durante la germinación es debida a la degradación de la proteína lo cual resulta en la liberación de AA. La disminución de la concentración de AA, generalmente a los 3 y 5 dds en las tres especies también ha sido observado en semillas de *Arabidopsis thaliana* después de la aplicación de un tratamiento de estratificación a 4°C y en semillas de *Lens culinaris* y *P. sativum* (Joosen *et al.*, 2013; Rosental *et al.*, 2014). En otras especies también se ha observado un incremento en la concentración de AA durante la germinación (Kuo *et al.*, 2004).

4.3.3.3. Azúcares Solubles Totales (AST)

Las semillas de *Lupinus* durante su maduración acumulan grandes cantidades de carbohidratos los cuales representan 10-20% de su materia seca y son muy importantes para la germinación debido a que proveen energía para este proceso (Zalewski *et al.*, 2010).

La aplicación de tratamientos pre-germinativos afectó significativamente la concentración de AST en las tres especies (Figura 4.6). En *L. exaltatus* la mayor concentración promedio de AST se encontró en el tratamiento testigo con 381.47 mg g⁻¹ PS. En contraste, todos los tratamientos pre-germinativos presentaron una disminución en el contenido de AST respecto al testigo, aunque la disminución no fue significativa, sin embargo solo en el tratamiento de H₂O 80°C 1min (PG6) la concentración de AST fue significativamente diferente al testigo (-26%). En promedio, fue a los 3 dds donde se observó la mayor disminución de estos azúcares (38%, respecto al día 0), lo cual podría estar relacionado con el inicio de la

germinación. Únicamente a los 10 dds se observó un incremento en azúcares en el tratamiento PG4 casi similar a la concentración de testigo.

En cuanto a las semillas de *L. campestris*, la concentración de AST disminuyó en todos los tratamientos y no se encontraron diferencias entre tratamientos (Figura 4.7 a). La mayor concentración de AST fue en el testigo con 397.28 mg g⁻¹ PS. A los 3 dds, los azúcares disminuyeron un 93%, respecto al día 0. Únicamente en el testigo se observó que la concentración inicial de AST incrementó de 356.81 mg g⁻¹ a 506.17 mg g⁻¹ PS durante la germinación. En semillas de *Cyclocarya paliurus* que han sido sometidas a un tratamiento de estratificación (5°C) también se ha observado un incremento en la concentración de AST (Shen-zuo y Jian-yuan *et al.*, 2007).

De igual manera los AST en *L. montanus* (Figura 4.7 b) disminuyeron en todos los tratamientos, aunque la mayor disminución fue en el PG6 (23%), respecto al testigo. A los 3 dds los azúcares disminuyeron en todos los tratamientos, posteriormente a los 5 dds se observó un incremento en el PG2 (437.05 mg g⁻¹ PS) y PG4 (378.64 mg g⁻¹ PS), casi similar al testigo (515.56 mg g⁻¹ PS), sin embargo en los días posteriores disminuyeron. Esta disminución de AST también ha sido reportada durante la germinación en cotiledones de *Erythrina velutina* Willd. (Ribeiro *et al.*, 2012), en semillas de *Lupinus luteus* L. germinadas a 20°C (Zalewski *et al.*, 2010) y en la liberación de latencia en embriones de *Malus domestica* tratados con HCN (Bogatek *et al.*, 1999). Probablemente la disminución de estos azúcares en la germinación podría estar relacionada con la activación inicial del metabolismo de la semillas, para proveer energía para la germinación antes de la movilización de reservas, sin embargo el uso de los azúcares es variable dependiendo de la especie donde pueden ser utilizados para la germinación o bien para el crecimiento de las plántulas (Pritchard *et al.*, 2002). Posiblemente la razón por la cual en el tratamiento PG6 en *L. exaltatus* y *L. campestris* los azúcares disminuyeron comparados con el testigo esté relacionada con el PG, por la mayor demanda de energía, además la concentración de AR se vio beneficiada por la disminución de AST, en las dos especies se observó esta relación.

4.3.3.4. Azúcares Reductores (AR)

La aplicación de tratamientos pre-germinativos afectó la concentración de AR en las tres especies (Figura 4.8).

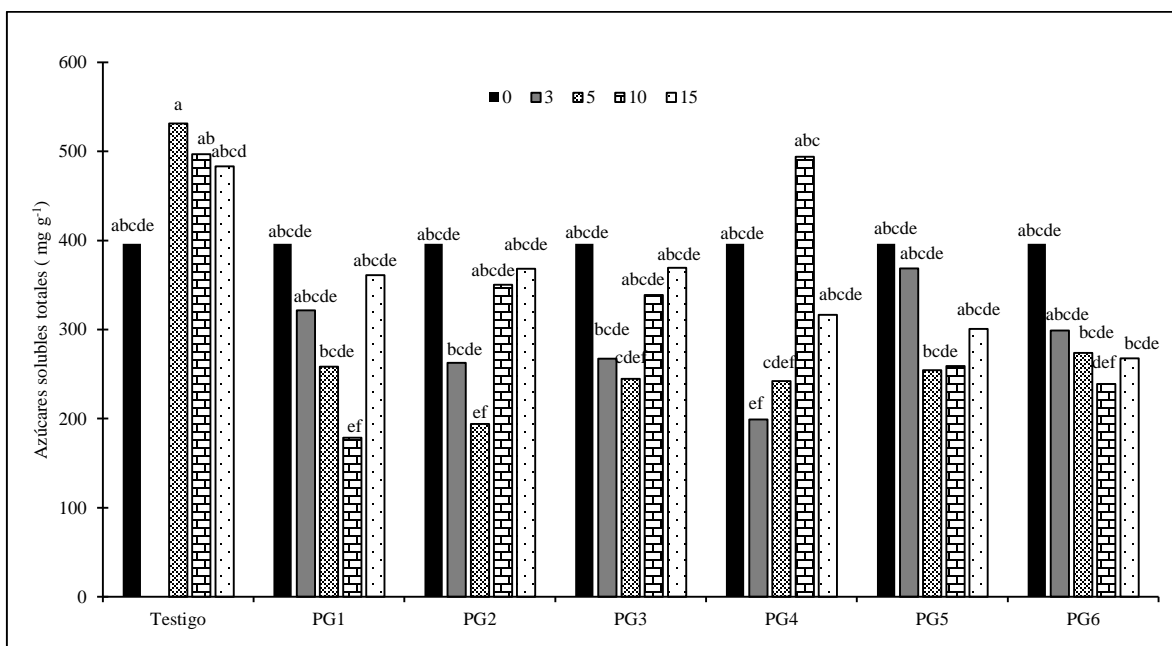


Figura 4.6. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la concentración de azúcares solubles totales (mg g^{-1} PS) en semillas de *L. exaltatus*. **Testigo:** semillas sin tratamiento; **PG1:** H_2SO_4 15 min; **PG2:** H_2O 80°C 5 min; **PG3:** Arena húmeda 35°C 8h seguido de 16h 25°C ; **PG4:** Arena seca 80°C 7 min; **PG5:** Arena 150°C 1 min; **PG6:** Arena húmeda 80°C 1 min. Letras diferentes por tratamiento, son significativamente diferente ($p < 0.05$).

En semillas de *L. exaltatus*, en general, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos respecto al testigo a excepción del PG6, donde la cantidad de AR superó al testigo con un 63%, en promedio. Los AR presentaron un comportamiento de incrementos y disminuciones a lo largo de la germinación. Este efecto fue más evidente en los tratamientos PG1, PG3 y PG6, siendo a los 5, 10 y 15 dds donde se observó en promedio mayor incremento. En el caso de *L. campestris*, la disminución en la concentración promedio de AR respecto al testigo fue en los tratamientos PG1 (27%), PG2 (15%), PG3 (48.3%) y PG5 (41.8%). El mayor incremento de AR se observó en el PG6 con una diferencia de 18.4%.

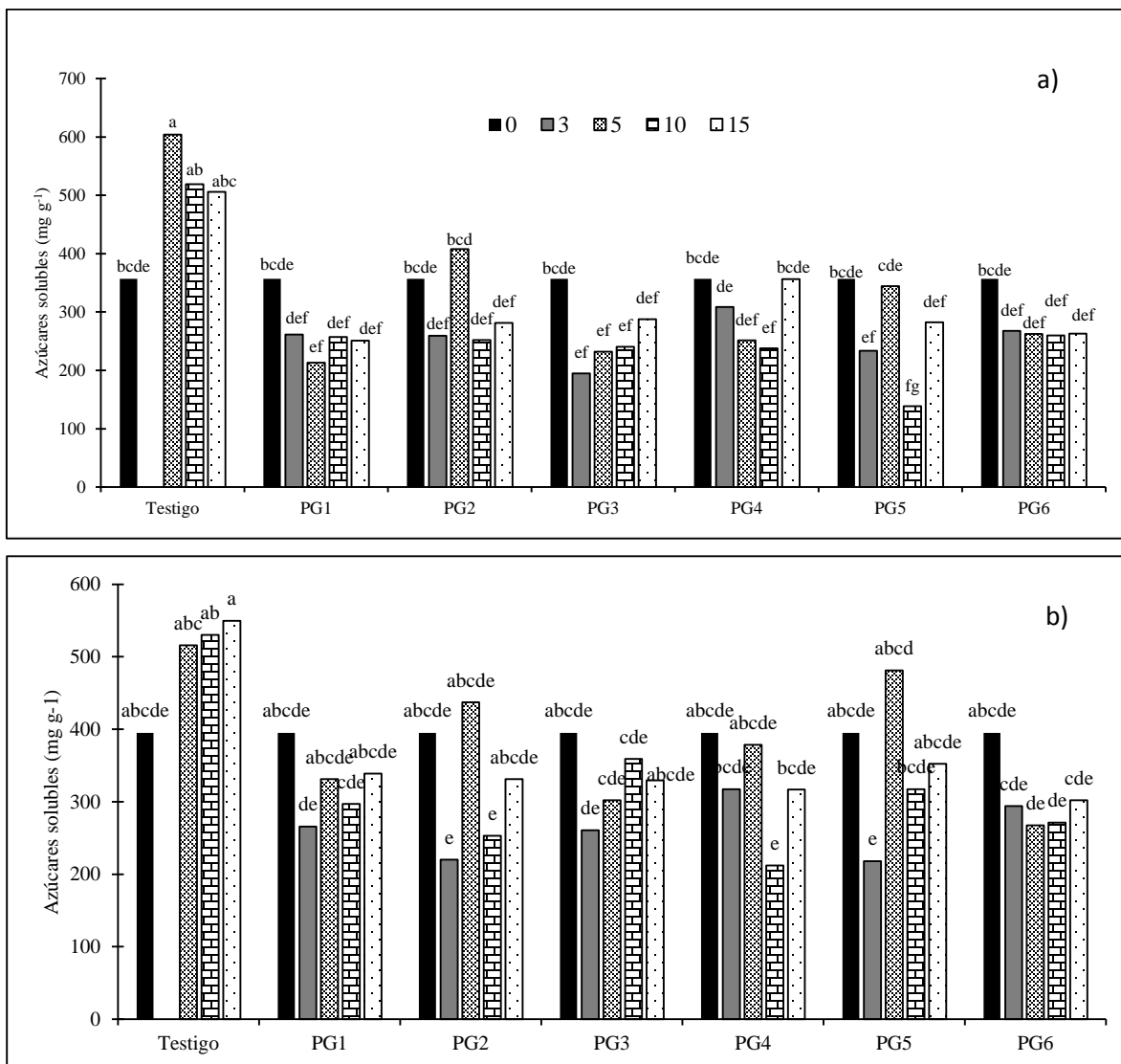


Figura 4.7. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la concentración de azúcares solubles totales (mg g⁻¹ PS) en semillas de *L. campestris* (a) y *L. montanus* (b). **Testigo:** semillas sin tratamiento; **PG1:** H₂SO₄ 15 min; **PG2:** H₂O 80°C 5 min; **PG3:** Arena húmeda 35°C 8h seguido de 16h 25°C; **PG4:** Arena seca 80°C 7 min; **PG5:** Arena 150°C 1 min; **PG6:** Arena húmeda 80°C 1 min. Letras diferentes por tratamiento, son significativamente diferentes (p<0.05).

La aplicación de tratamientos pre-germinativos afectó de manera significativa la concentración de AR, disminuyendo drásticamente a los 3 dds (72%) en promedio. En todos los tratamientos se observó una disminución en la concentración de AR entre los 5 y 10 dds, a excepción del tratamiento PG6 donde esta disminución se observó a los 10 y 15 dds, coincidiendo, en este tratamiento, con la máxima TG. A los 5 dds la concentración de AR incrementó de manera significativa en el tratamiento PG4 (13%, respecto al testigo),

finalmente a los 15 dds los azúcares disminuyeron en todos los tratamientos. Esto podría deberse a que los azúcares son utilizados como fuente de energía para el crecimiento radicular y posteriormente el crecimiento de la plántula (Bewley *et al.*, 2013), además el incremento que se pudo observar en los tratamientos (PG1, PG2, PG3 y PG5) a los 10 y 15 dds podría estar relacionado con el inicio de la fotosíntesis debido a que a esta edad las plántulas estaban perfectamente desarrolladas.

En cuanto *L. montanus*, no se encontraron diferencias significativas en la concentración promedio de la mayoría de los tratamientos, respecto al testigo, únicamente en el tratamiento PG6 se observó un incremento promedio de 127% (Figura 4.9). En general a los 3 dds se observó una disminución de 50%, respecto al día 0, en los días posteriores los azúcares se incrementaron. En los 3, 5 y 10 dds, la concentración de AR fue mayor en el PG6, finalmente a los 15 dds se incrementó el contenido de AR en el PG1 y PG2 y disminuyó en el PG6 y el testigo. En general, el incremento en la concentración de AR durante la germinación en las tres especies podría estar relacionado con la disminución de AST, debido a la movilización y la hidrólisis de los polisacáridos de las semillas. Los polisacáridos pueden ser fuertemente hidrolizados por hidrolasas las cuales podrían ser responsables del incremento en los azúcares reductores durante la germinación (Rosental *et al.*, 2014).

Se ha observado que la aplicación de tratamientos pre-germinativos que incluyen agua caliente para la liberación de latencia, en semillas de *Oriza sativa*, incrementa la actividad de α -amilasa (Tung y Serrano, 2011). Tal vez el incremento de una enzima que hidrolice polisacáridos para formar azúcares más simples durante la germinación, esté relacionado al incremento de AR observado en el tratamiento con agua a 80°C 1 min (PG6) en las especies en estudio.

4.3.3.5. Polifenoles Totales (PFT)

Durante la protrusión de la radícula se activan diversos procesos bioquímicos, estos procesos pueden cambiar la composición de metabolitos primarios y secundarios los cuales podrían afectar la actividad de compuestos fenólicos (Xu *et al.*, 2009)

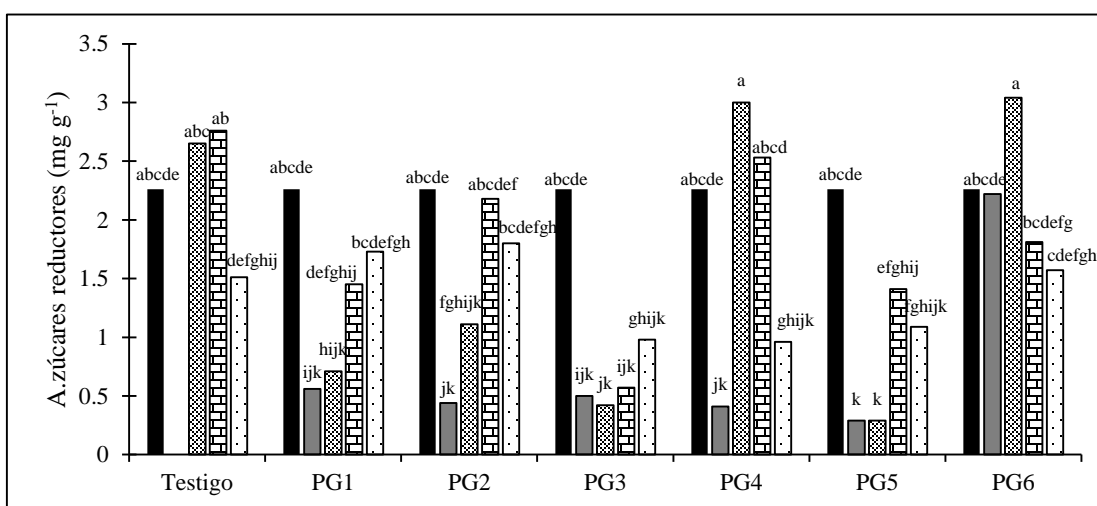
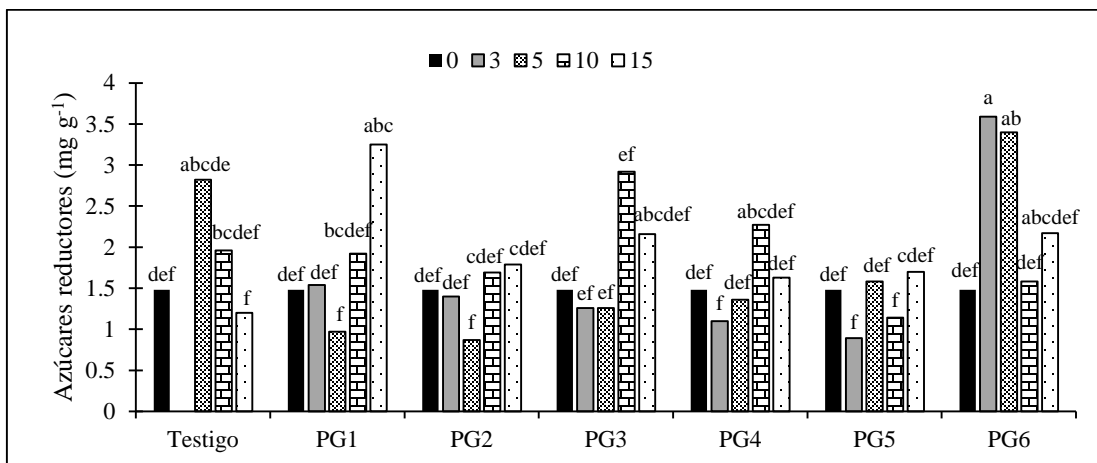


Figura 4.8. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la concentración de azúcares reductores ($\text{mg g}^{-1}\text{PS}$) en semillas de *L. exaltatus* (a) y *L. campestris* (b). **Testigo:** semillas sin tratamiento; **PG1:** H_2SO_4 15 min; **PG2:** H_2O 80°C 5 min; **PG3:** Arena húmeda 35°C 8h seguido de 16h 25°C ; **PG4:** Arena seca 80°C 7 min; **PG5:** Arena 150°C 1 min; **PG6:** Arena húmeda 80°C 1 min. Letras diferentes por tratamiento, son significativamente diferente ($p < 0.05$).

La concentración de los compuestos fenólicos en semillas de *L. exaltatus* (Figura 4.10 a) fue afectada de manera significativa en todos los tratamientos, siendo el H_2O 80°C 1 min (PG6) donde se observó la mayor concentración ($3.49 \text{ mg g}^{-1}\text{PS}$). En promedio, fue a los 3 dds donde la concentración de PFT disminuyó 12%, respecto al día cero y posteriormente fue aumentando a partir de los 5 dds en todos los tratamientos.

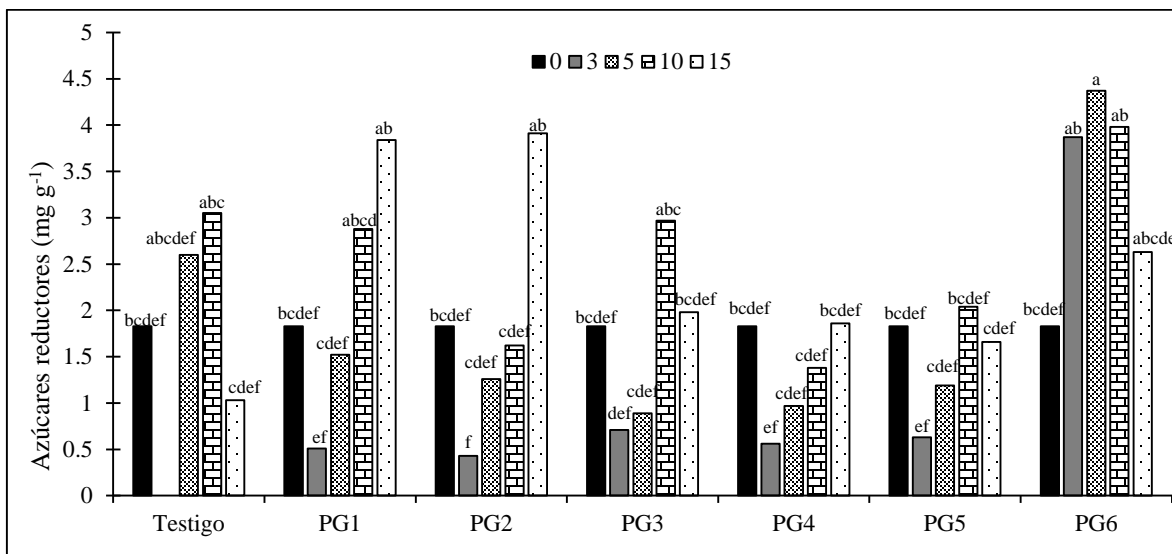


Figura 4.9. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la concentración de azúcares reductores (mg g^{-1} PS) en semillas de *L. montanus*. **Testigo:** semillas sin tratamiento; **PG1:** H_2SO_4 15 min; **PG2:** H_2O 80°C 5 min; **PG3:** Arena húmeda 35°C 8h seguido de 16h 25°C ; **PG4:** Arena seca 80°C 7 min; **PG5:** Arena 150°C 1 min; **PG6:** Arena húmeda 80°C 1 min. Letras diferentes por tratamiento, son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

El mayor incremento en promedio se observó a los 10 dds (5%). En los tratamientos H_2SO_4 98% 15 min (PG1), arena 150°C 1 min (PG5) y H_2O 80°C 1 min (PG6), los compuestos fenólicos se incrementaron a los 5 y 10 dds para finalmente disminuir a los 15 dds. El incremento en la concentración de los compuestos fenólicos en los tratamientos PG1 y PG6 está relacionado al PG (34.4 y 23%), no siendo el caso para el tratamiento PG5 (Arena 150°C 1 min) debido a que este procedimiento inhibió la germinación. Aunque las semillas de este tratamiento no germinaron si llegaron a la fase lag durante la germinación lo que nos lleva a suponer que hay una síntesis de PFT durante la imbibición. Otra razón por la cual suponemos que se incrementaron estos metabolitos secundarios es que las semillas ya embebidas comenzaban a ser atacadas por hongos y bacterias y de acuerdo a la literatura los compuestos fenólicos son sintetizados para proteger a las semillas contra el daño por patógenos (Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

Un efecto similar fue observado en *L. campestris* (Figura 4.10 b) donde la concentración de PFT en todos los tratamientos pre-germinativos superó al testigo. No se encontraron diferencias significativas entre los dds, únicamente a los 10 dds en el tratamiento PG4 la

concentración de PFT disminuyó 11%, respecto al testigo. Al igual que en las otras especies en *L. montanus* (Figura 4.11), los PFT se incrementaron después de la aplicación de tratamientos pre-germinativos, se observó el mayor incremento a los 10 dds en un 79% respecto al día 0, similar a lo reportado por Juárez-Fuentes (2013) (84%) en semillas de *L. montanus*. Fue en los tratamientos PG1 y PG6 donde la concentración fue mayor (1.97 y 1.81 mg g⁻¹ PS) que todos los tratamientos. En los tratamientos pre-germinativos la concentración de PFT presentó una tendencia a incrementarse mientras que en el testigo la tendencia era a disminuirse. La aplicación de un tratamiento térmico a 80°C en las tres especies favoreció el incremento en la concentración de compuestos fenólicos, sin embargo este incremento no coincide con los resultados de Xu y Chang (2009) ya que ellos encontraron que un tratamiento térmico (100°C) en semillas de *Phaseolus vulgaris* L. disminuye drásticamente los compuestos fenólicos, y con Rusydi y Azrina (2012) que también reportan una disminución de los compuestos fenólicos en semillas de cacahuete 57.12%.

Posiblemente el incremento en la concentración promedio de PFT en los tratamientos de H₂SO₄ 98% 15 min (PG1) y H₂O 80°C 1 min (PG6) esté relacionado con el PG. Diferentes investigadores han descrito un incremento en la concentración de PFT durante el proceso de germinación en semillas *Vigna radiata* L., *Avena nuda* L., *Cicer arietinum*, *L. campestris*, *Chenopodium quinoa* (Trosynska *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009; Tarzi *et al.*, 2012; Jiménez-Martínez *et al.*, 2012; Carciochi *et al.*, 2013). Cevallos-Casals y Cisneros-Zeballos (2010) también reportaron un incremento en el contenido de compuestos fenólicos en semillas de 13 especies que incluían leguminosas, en el paso del estado latente a no latente. El incremento en los compuestos fenólicos podría estar relacionado a que estos juegan un papel muy importante en la protección de células y están involucrados en el fortalecimiento de las paredes celulares de las plantas durante su crecimiento (Vayupharp y Laksanalamai, 2013). Además de acuerdo con López-Amorós *et al.* (2006), el incremento en los compuestos fenólicos está relacionado con la activación de enzimas hidrolasas y polifenoloxidasas las cuales incrementan su actividad durante la germinación.

Cabe mencionar que de las tres especies, *L. exaltatus* y *L. campestris* presentaron mayor contenido de PFT comparadas con *L. montanus*, que fue la especie que menor PG presentó.

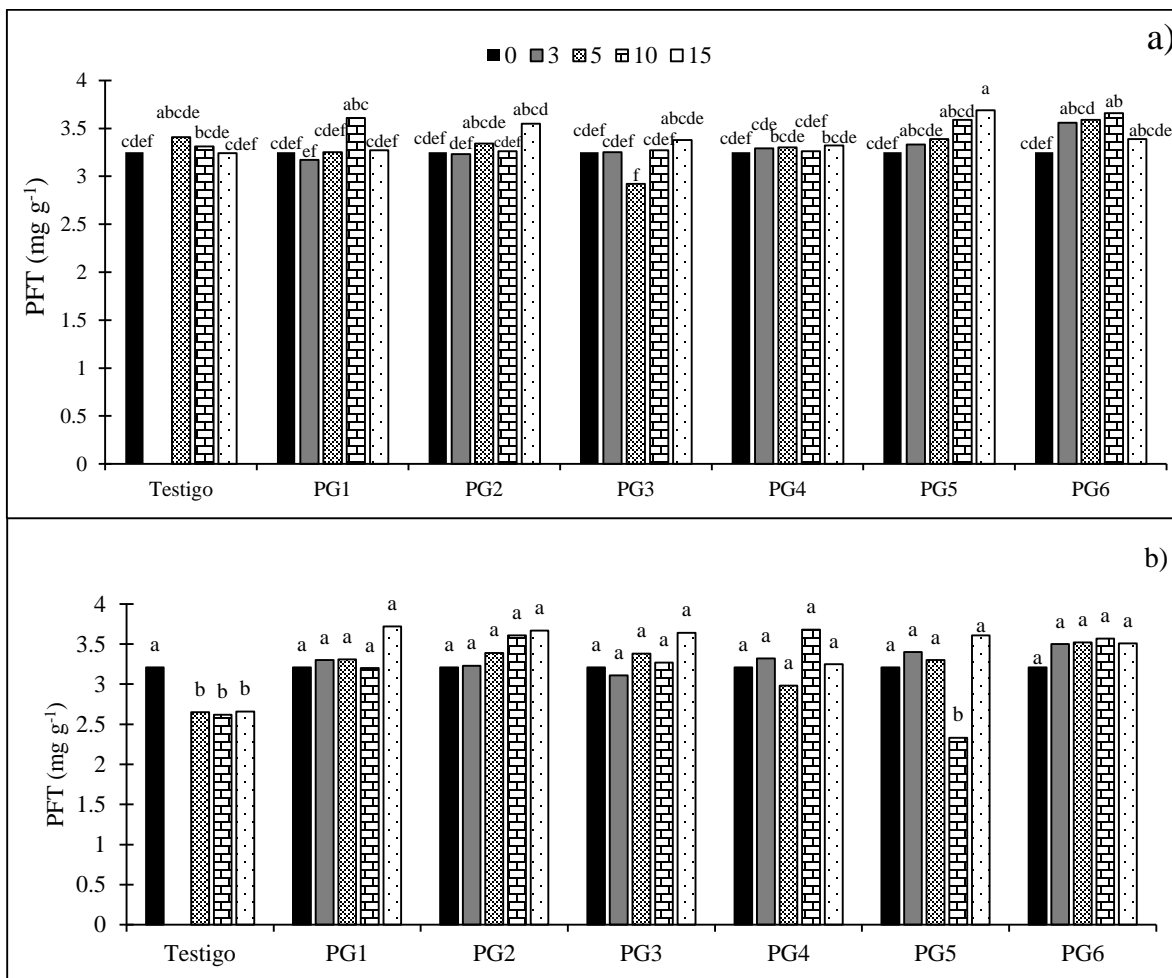


Figura 4.10. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la concentración de polifenoles totales (mg g⁻¹ PS) (PFT) en semillas de *L. exaltatus* (a) y *L. campestris* (b). **Testigo:** semillas sin tratamiento; **PG1:** H₂SO₄ 15 min; **PG2:** H₂O 80°C 5 min; **PG3:** Arena húmeda 35°C 8h seguido de 16h 25°C; **PG4:** Arena seca 80°C 7 min; **PG5:** Arena 150°C 1 min; **PG6:** Arena húmeda 80°C 1 min. Letras diferentes por tratamiento, son significativamente diferente (p<0.05).

Y de acuerdo con la literatura los altos contenidos de compuestos fenólicos interfieren en la absorción de agua y el intercambio gaseoso (Ramakrishna y Ravishankar, 2011). Sin embargo las semillas de *L. montanus* aun con menores concentraciones de PFT alcanzaron PG menores comparados con las otras especies con mayores compuestos fenólicos. Lo que indica que la latencia en esta especie, responde a otros factores externos e internos de la semilla.

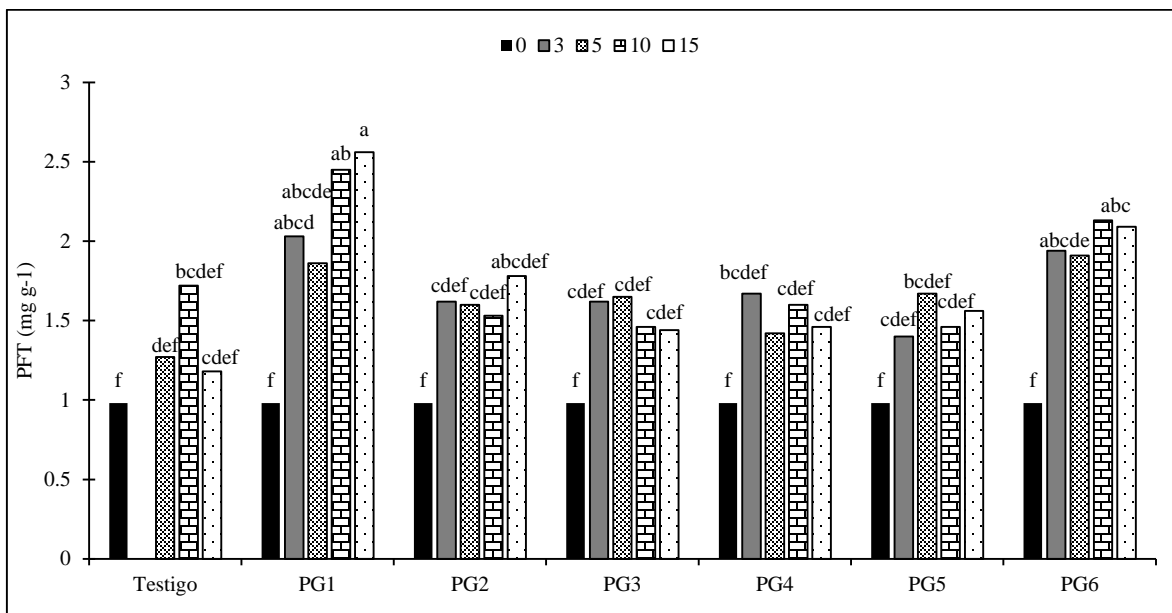


Figura 4.11. Efecto de tratamientos pre-germinativos sobre la concentración de polifenoles totales (mg g^{-1} PS) (PFT) en semillas de *L. montanus*. **Testigo:** semillas sin tratamiento; **PG1:** H_2SO_4 15 min; **PG2:** H_2O 80°C 5 min; **PG3:** Arena húmeda 35°C 8h seguido de 16h 25°C ; **PG4:** Arena seca 80°C 7 min; **PG5:** Arena 150°C 1 min; **PG6:** Arena húmeda 80°C 1 min. Letras diferentes por tratamiento, son significativamente diferente ($p < 0.05$).

4.3.3.6. Ácido Absísico (ABA)

Para el análisis de ABA únicamente se evaluó el mejor tratamiento pre-germinativo, en este caso fue el de agua a 80°C 1 min (PG6). Se observó mayor concentración de ABA en las semillas sin tratamiento, siendo *L. montanus*, la especie con mayor concentración de ABA ($1.30 \text{ pmoles mL}^{-1}$), seguido de *L. exaltatus* ($0.97 \text{ pmoles mL}^{-1}$) y *L. campestris* ($0.77 \text{ pmoles mL}^{-1}$) (Figura 4.12). Estos resultados están relacionados con el PG debido a que el ABA actúa como un inhibidor de la germinación (Toh *et al.*, 2008). Después de la aplicación del tratamiento en semillas sin germinar la concentración de ABA disminuyó en las tres especies, siendo *L. exaltatus* donde la concentración de ABA fue más afectada. Resultados similares fueron observados en semillas de *Arabidopsis* bajo un tratamiento térmico a 34°C , el cual suprime la concentración de ABA (Toh *et al.*, 2008). Un efecto similar fue observado en semillas de *Hordeum distichum* L. cv Triumph después de la aplicación de un tratamiento con H_2SO_4 para la liberación de la latencia donde concentración de ABA también fue disminuida (Wang *et al.*, 1998).

Posteriormente después de la aplicación del tratamiento a los 30 dds la concentración de ABA incrementó nuevamente en las tres especies, pero no alcanzó los niveles de las semillas sin tratamiento.

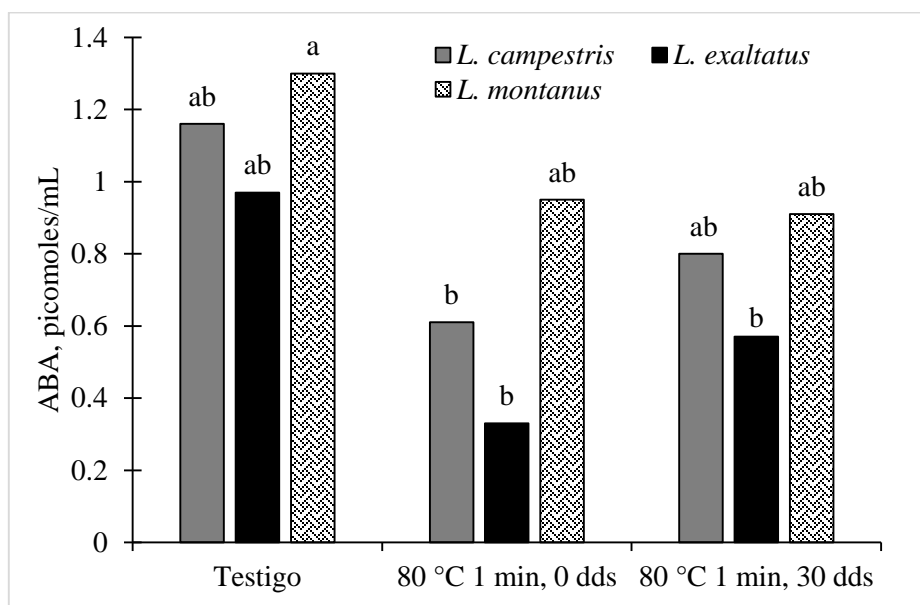


Figura 4.12. Efecto del agua 80°C 1 min sobre la concentración de ácido absísico (ABA) en semillas de *Lupinus* sp. Letras diferentes, son significativamente diferentes ($p < 0.05$). dds: días después de siembra.

4.4. Conclusiones

- Los tratamientos pre-germinativos que utilizan H_2SO_4 o agua caliente liberan la latencia en las semillas de las especies en estudio, superando a todos los tratamientos.
- La respuesta de las especies a los tratamientos pre-germinativos fue diferencial.
- La inmersión de semillas en agua a 80°C 1 min y arena húmeda a 80°C 1 min promueven la germinación en *L. exaltatus* (41.3 %) y *L. campestris* (69%). Para la especie de *L. montanus* (37%) el mejor tratamiento fue H_2SO_4 concentrado.
- Los tratamientos pre-germinativos que promovieron germinación incrementaron la concentración de proteína soluble, aminoácidos libres, azúcares reductores y polifenoles totales pero disminuyeron la concentración de azúcares solubles totales.

- El tratamiento de agua a 80°C 1 min disminuyó la concentración de ABA en las tres especies, respecto a las semillas sin tratamiento.

4.5. Literatura citada

Ali, H.H., A. Tanveer., M. Ather, N, and H. Naeem, A. 2011. Methods to break seeds dormancy of *Rhynchosia capitata*, a summer anual weed. Chilean Journal of Agricultural Research. 71(3): 483-487.

Amritphale, D., Y. Sreenivasulu, and B. Singh. 2000. Changes in membrane fluidity and protein composition during release of cucumber seeds from dormancy by a higher temperature shift. Annals of Botany .85:13-18

Atencio, L., R. Colmenares., M. Ramírez-Villalobos y D. Marcano. 2003. Tratamientos pregerminativos en acacia San Francisco (*Peltrophorum pterocarpum*) Fabacea. Rev. Fac. Agron. 20(1): 63-71.

Baskin, C.C. 2003. Breaking physical dormancy in seeds-focussing on the lens. New Phytologist. 158: 227-238.

Baskin, J. M. and C. C. Baskin. 2004. A classification system for seed dormancy. Seed Sci. Res. 14(1): 1-16.

Benítez-Rodríguez, A., M. Gamboa-de Buen, E. Sánchez-Coronado., S. Alvarado-López, D. Soriano, I. Méndez, S. Vázquez-Santana, J. Carabias-Lillo, A. Mendoza and A. Orozco-Segovia. 2013. Effects of seed burial on germination, protein concentration and seedling survival in *Dodonaea viscosa*. Plant Biology. doi:10.1111/plb.12110.

Bewley, J. D., K. J. Bradford., H. W. M. Hilhorst, and H. Nonogaki. 2013. Seeds: Physiology and Dormancy. 3rd edition. Springer New York. 392pp.

Bogatek, R., D. Come, F. Corbineau, M.A. Picard., B.Zarska-Maciejewska, S. Lewaka.1999. Sugar metabolism as related to the cyanide-mediated elimination of dormancy in apple embryos. Plant Physiol. Biochem. 37 (7/8): 577-585.

Carciochi, R.A., Manrique, G.D. and Dimitrov, K. 2014. Changes in phenolic composition and antioxidant activity during germination of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Wild.) International Journal. 21(2):767-773.

Cevallos-Casals, B. A. and Cisneros-Zevallos L. 2010. Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. Food Chem. 119(4): 1485–1490.

Di Nola, L. and R. B. Taylorson. 1990. Changes in the composition and synthesis of proteins in cellular membranes of *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. seeds during the transition from dormancy to germination. Plant Physiol. (1990) 92: 427-433.

Elliot, C.A., D. G. Fischer and C. J. Le Roy. 2011. Germination of three native *Lupinus* species in response to temperature. Northwest Sci. 85(2): 403-410.

Gutiérrez-Nava, P., F. De León González, J. Etchevers, B., and A Casas-Fernández. 2010. Effect of scarification, self-inhibition, and sowing depth on seed germination of *Lupinus campestris*. Chil. J. Agr. Res. 70 (3): 365-371.

Hernández-Ferretiz, E., R. K. Rivera M., O. J. Ramos H., F. C. Salinas P., M. Rodríguez M., and K. Bermúdez T. 2008. Influence of seed coat treatments on germination and early seedling growth of *Lupinus varius* L. Pak. J. Bot. 36(1): 65-74.

Jiménez-Martínez, C., A. Cardador-Martínez., A. L. Martínez-Ayala., M. Muzquiz., M. Martín-Pedrosa, and G. Davila-Ortiz. 2012. Changes in protein, nonnutritional factors, and antioxidant capacity during germination of *L. campestris* seeds. International Journal of Agronomy. Volume 2012, Article ID 387407, 7 pages doi:10.1155/2012/387407.

Joosen, R.V.L., D. Arends, Y. Li, A.J. L. Willems, J.B. J. Keurentjes, W. Ligterink, R. C. Jansen, and H.W.M. Hilhorst. 2013. Identifying genotype-by-environment interactions in the metabolism of germinating *Arabidopsis* seeds using generalized genetical genomics. Plant Physiology. 162: 553-556.

Karaguzel, O., S. Cakmakci., V. Ortacesme, and B. Aydinoglu. 2004. Influence of seed coat treatments on germination and early seedling growth of *Lupinus varius* L. Pak. J. Bot. 36(1): 65-74.

Khadri, M., N.A. Tjera, and C. Lluch. 2006. Allevation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris*) by exogenous abscisic acid supply. J. Plant Growth Regul. 25: 110-119.

Kishwar, A., R. S. Guijar., R. Niwas., M. Gopal, and A. Tyagi. 2011. A rapid method for estimation of acid and characterization of ABA regulated gene in response to water deficit stress from rice. American Journal of Plant Physiology. 6(3): 144-156.

Kuo, Y.H., P. Rozan., F. Lambein., J. Frias, and C. Vidal-Valverde. 2004. Effects of different germination conditions on the content of free protein and non-protein amino acids of commercial legumes. Food Chemistry. 86: 537-545.

López-Amorós, M.L., T. Hernández and I. Estrella. 2006. Effect of germination on legumes compounds and their antioxidant activity. Journal Food Composition and Analysis. 19: 227-283.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Mathenson, N.K. and Harpal, S. Saini. α -L- Arabinofuranosidases and β -D-Galactosidases in germinating lupin cotyledons. 1977. Carbohydrate Research. 57:103-116.

Müntz, K., M.A. Belozersky, Y.E. Dunaevsky, A. Schlereth and J. Tiedemann. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. J. Experimental Botany. 52(362): 1741-1752.

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

Pereira, G.E., F. Sales de Jesús S., S. dos Santos S., D. de Souza T., J. Silva and B.C. Clifton C. 2011. Dormancy breaking in *Ormosia arborea* seeds. *International Journal of Agronomy*. ID 524709, 5 pages

Pritchard, S.L., W. L. Charlton., A. Baker and I.A. Graham. 2002. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 31(5): 639-647.

Qihe, Y., Y. Xiaojuan, and Y. Wanhui. 2006. Dormancy mechanism and breaking methods for hard seeds. *Chinese Bulletin of Botany*. 23(1): 108-118.

Ramakrishna, A. and G. A. Ravishankar. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*. 6(11): 1720-1731.

Ribeiro, R.C.R., B. França D., and C. R. Pelacani. 2012. Mobilization of reserves and germination of seeds of *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae – Papilionoideae) under different osmotic potentials. *Revista Brasileira de Sementes*. 34 (4): 580 – 588.

Robles-Díaz E., E. Jurado., M. Ruiz-López, L. Yáñez-Espinosa, and J. Flores. 2014. Heat shock effect in breaking physical dormancy in seeds of *Lupinus elegans* and *L. rotundiflorus* from Jalisco, México. *Botanical sciences* 92 (1): 123-129.

Rodríguez-Gacio, M. C., M. A. Matilla-Vazquez, and A. J. Matilla. 2009. Seed dormancy and ABA signaling. *The Breakthrough goes on*. *Plant signaling & Behavior* 4 (11): 1035-1048.

Rosental, L., H. Nonogaki, and A. Fait. 2014. Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research*. 24: 1-15.

Rusydi, M. M.R. and Azrina, A. 2012. Effect of a germination on total phenolic, tannin and phytic acid contents in soy bean and peanut. *International Food Research Journal*. 19(2):676-677.

Sánchez, J.A., J. Reino, B. Muñoz, Y. González., L. Montejo y 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 (3): 209-220.

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

Satyanarayana, B., P. Subhashinidevi, and A. Arundhati. 2011. Biochemical changes during seed germination of *Sterculia urens* Roxb. *Not. Sci. Biol.* 3(3): 105-108.

Schelin, M., Tigabu, M., Ericksson, I., Sawadogo, L. and Odén, P.C. 2003. Effects of scarification, gibberelic acid and dry heat treatments on the germination of *Balanites aegyptica* seeds from the sudani savanna in Burkina Faso. *Seed Sci. & Technol.* 31: 605-617.

Shen-zuo, F. and W. Jia-yuang. 2007. Changes in biochemical composition and enzyme activity during dormancy release of *Cyclocarya paliurus* seeds. *For. Stud. China* 9(1):7-13.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol Chem* 195: 19-23.

Sussulini, A., J.S. García., M.F. Mesko., D.P. Moraes., E.M.M. Flores., C.A. Pérez., and M.A.Z. Arruda. 2007. Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis. *Microchim Acta.* 158: 173-180.

Tarzi, B.G., M. Gharachorloo., M. Bahariniab and S. A. Mortazavic. 2011. The effect of germination on phenolic content and antioxidant activity of chickpea. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 11 (4): 1137-1143.

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* Volume 2014, Article ID 647469, 6 p.

Toh, S., A. Imamura, A. Watanabe, K. Nakabayashi, M. Okamoto, Y. Jikumaru, A Hanada, Y Aso, K Ishiyama, N. Tamura, S. Luchi, M. Kobayashi, S. Yamaguch I., Y Kamiya, E. Nambara, and N. Kawakam. 2008. High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol.* 146: 1368–1385.

Tonguc, M., R. Elkoyunu., S. Erbas, and Y. Karakurt. 2012. Changes in reserve composition during germination and initial seedling development of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) *Turk J. Biol.* 32: 107-112.

Troszyńska, A., Agnieszka W. and O. Narolewska. 2006. Effect of germination time on the content of phenolic compounds and sensory quality of mung bean (*Vigna radiate* L.) sprouts. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 56(4): 453-459.

Tung, L. D., and E. P. Serrano. 2011. Effects of warm water in breaking dormancy of rice seed. *Omonrice.* 18: 129-136.

Vayupharp, B. and Laksanalamai, V. 2012. Recovery of antioxidants from grape seeds and its application in fried food. *J. Food Process Technol.* 3:152. doi:10.4172/2157-7110.1000152.

Wang, M., R. M. van der Meulen, K. Visser, V. S. Henk-Peter, B. Van Duijn and A. H. de Boer. 1998. Effects of dormancy-breaking chemicals on ABA levels in barley grain embryos. *Seed Science Research.* 8: 129-137.

Xu J.G., C.R. Tian., J. Y. Luo., X. D. Wang, and X. D. Tian. 2009. Dynamic changes in phenolic compounds and antioxidant activity in oats (*Avena nuda* L.) during steeping and germination. *J. Agric. Food Chem.* 57(21): 10392-10398.

Xu, B. and S. K.C. Chang. 2009. Total phenolic, phenolic acid , anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *J. Agric. Food Chem.* 57(11): 4754-4764.

Yemm, E. W. and A. J. Cocking. 1955. The Estimation of carbohydrates in plant extracts by Anthrone. *Biochemical Journal* 57(3): 508–5.

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

Zuluaga- 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 Recomendaciones

5.1. Conclusiones generales

En base a los objetivos planteados en la presente investigación se concluye:

- Las semillas de *Lupinus* presentan latencia física.
- Los tratamientos de regímenes de temperatura afectaron de manera significativa el porcentaje de germinación de las tres especies en estudio, aunque la germinación inducida fue extremadamente baja; en promedio 4.32% para *L. campestris*, 6.61% en *L. exaltatus* y 4.27% en *L. montanus*.
- El régimen de temperatura 20-15°C promovió mayor germinación en las tres especies: *L. campestris* con 4.49%, *L. exaltatus* con 7.63% y *L. montanus* con 7.33%.
- La tasa de germinación fue afectada por los regímenes de temperatura. En *L. campestris* la mayor tasa (0.31 semillas día⁻¹) se observó en el régimen de 35-25°C, en *L. exaltatus* y *L. montanus* en 20-15°C (0.43 semillas día⁻¹ y 0.45 semillas día⁻¹, respectivamente).
- En general se observó que las temperaturas 25°C y 35/25°C reducen el porcentaje y tasa de germinación de *L. montanus* y mientras que la temperatura 15/10°C reduce los de *L. campestris*.
- La aplicación de regímenes de temperatura afecta de manera significativa la movilización de reservas por especie y tiempo de germinación, aún cuando los porcentajes de germinación resultantes sean bajos.
- El tratamiento 20-15°C incrementó significativamente la movilización de proteína, aminoácidos y carbohidratos en la especies en estudio.
- Los tratamientos pre-germinativos físicos y químicos aplicados a las especies de *Lupinus*, lograron reblandecer la testa de las semillas, romper la latencia física e incrementar el porcentaje y la tasa de germinación, aunque no se alcanzó el 100% de germinación.
- El tratamiento de agua a 80°C 1 min incrementó el porcentaje de germinación en semillas de *L. exaltatus* (41%) y *L. campestris* (69%), no siendo el caso de *L. montanus* (36%) donde el mejor tratamiento fue el tratamiento con ácido sulfúrico

concentrado 15 min (37%) (PG1). La tasa de germinación bajo este tratamiento fue de 0.81 semillas día⁻¹ para *L. campestris*, 0.49 semillas día⁻¹ para *L. exaltatus* y 0.52 semillas día⁻¹ para *L. montanus*.

- La mayor tasa de germinación se observó con el tratamiento de ácido sulfúrico en las tres especies. Esta fue de 2.27 semillas día⁻¹ en *L. campestris*, 1.95 semillas día⁻¹ en *L. exaltatus* y 2.22 semillas día⁻¹ en *L. montanus*.
- La movilización de reservas en las semillas se incrementó por efecto de la aplicación de tratamientos pre-germinativos, especialmente en aquellos que promovieron mayor germinación.
- En semillas *L. exaltatus*, *L. campestris* y *L. montanus* pretratadas con agua a 80°C 1 min, se incrementó la concentración de proteína (53, 17, 43%, respectivamente), aminoácidos libres (19, 44 y 31%), azúcares reductores (63, 18 y 96%) y polifenoles totales (32, 55 y 75%) pero disminuyó la concentración de azúcares solubles totales (22, 29 y 23%), respecto a la de semillas no tratadas.

5.2. Recomendaciones

- Evaluar el crecimiento y desarrollo de plántulas después del pretratamiento con agua a 80°C 1 min.
- Evaluar el efecto del preacondicionamiento húmedo de las semillas con temperatura a 80°C y diferentes tiempos de secado sobre el porcentaje, la tasa de germinación y el vigor de plántula.
- Evaluar métodos biológicos que degraden las paredes celulares de la testa e incrementen germinación.
- Profundizar en los mecanismos involucrados (biomoléculas, enzimas y genes) en la germinación de semillas ortodoxas como las de *Lupinus*.

VI. ANEXOS

A1. Preparación de reactivos para análisis de proteína soluble.

- **Solución Lowry:** Compuesta por 50 mL de solución **A** (0.5719 g hidróxido de sodio (NaOH) y 2.8606 g de carbonato de sodio anhídrido (Na₂CO₃), disueltos en 100 mL de agua), 0.5 mL de solución **B** (1.4232 g de sulfato cúprico (CuSO₄.5H₂O) en 100 mL de agua), 0.5 mL de solución **C** (2.8529 g de Tartrato de Sodio y Potasio (C₄H₄KNaO₆.4H₂O) disuelto en 100mL de agua.
- **Folin:** 3 mL de Folin Ciocalteu disueltos en 6 mL de agua.

Cuadro A1. Concentraciones de BSA para preparar curva de calibración en la determinación de proteína

No.	µL tomados de solución estándar de BSA, 1 mg / mL	µL de agua destilada	Concentración BSA mg/mL
1	0	500	0
2	20	480	0.04
3	40	460	0.08
4	60	440	0.12
5	80	420	0.16
6	100	400	0.2

A2. Preparación de reactivos para la determinación de azúcares solubles totales

- **Antrona:** 100 mg de Antrona se disolvieron en 2.5 mL de etanol al 80% y 47.5 mL de ácido sulfúrico al 70%.

Cuadro A2. Concentraciones de Glucosa para preparar curva de calibración en la determinación de Azúcares Solubles.

Nº de tubos	µL tomados de sol. Stock de Glucosa, 2.5 mg /mL	µL de agua destilada	Conc. de Glucosa µg/µL
1	0	600	0
2	300	300	50
3	300	300	100
4	300	300	150
5	300	300	200
6	300	300	250

A3. Preparación de reactivos para la determinación de azúcares reductores

- **Solución alcalina de tartrato de cobre:** compuesta por 24 mL de la solución **A** (2.5 g de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_4), 2.5 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), 2.5 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y 20 g de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), se disolvieron en 8 mL y se aforaron a 100 mL), 1 mL de la solución **B** (15 g de sulfato de cobre (CuSO_4), se disolvieron en un volumen pequeño de agua, se añadió una gota de ácido sulfúrico (H_2SO_4), finalmente se completó el volumen a 100 mL.
- **Arsenomolibdico:** 2.5 g de molibdato de amonio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), se disolvieron en 45 mL de agua destilada más 2.5 mL de ácido sulfúrico al 98% (H_2SO_4), posteriormente se añadió 0.3 g de arsenato de sodio di-básico ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), previamente disuelto en 25 mL de agua destilada. La mezcla se incubo a 37°C durante 48h.
- **Solución patrón de glucosa al 0.1 mg/mL:** se pesaron 100 mg de glucosa y se disolvieron en 100 mL de agua destilada, de esta solución se tomaron 10mL y se disolvieron en 100 mL.

Cuadro A3. Concentraciones de Glucosa para curva de calibración en la determinación de Azúcares Reductores.

N° de tubos	mL tomados del Stock de Glucosa, 0.1 mg/mL	mL de agua destilada	Conc. $\mu\text{g/mL}$ sol. Trabajo
1	0	2	0
2	0.2	1.8	10
3	0.4	1.6	20
4	0.6	1.4	30
5	0.8	1.2	40
6	1	1	50

A3. Preparación de reactivos para la determinación de aminoácidos libres

- **Reactivo ninhidrina** :compuesta por la solución **A** de NaOH 1N (20 g de NaOH, disueltos en 50mL de agua destilada), solución **B** Buffer de citrato 0.2M pH 5.0 (se disolvieron 21.008 g de ácido cítrico en 200 mL de agua destilada se agregaron 200 mL de la solución **A** y se aforó a 500mL, se ajustó el pH 5.0), solución **C** methyl cellosolve-ninhidrina (4g de ninhidrina ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$), se disolvieron en 100 mL de 2-

methoxyethanol, SIGMA, 64719-1L-F). De la solución **B** se tomarón 100 mL y en ella disolvieron 0.16 g de cloruro estañoso (SnCl_2). Esta solución se combinó con la solución **C**.

- **Solución patrón de Leucina a 0.1 mg/mL:** se pesaron 50 mg de Leucina y se disolvieron en 50 mL de agua de esta solución se tomarón 10 mL y se disolvieron en 100 mL de agua.

Cuadro A5. Concentraciones de Leucina para preparar curva de calibración en la determinación de aminoácidos.

Muestra	mL tomados sol. stock de Leucina	Volumen de agua destilada, mL	Concentración de Leucina mg/ mL
1	0	1	0
2	0.2	0.8	0.02
3	0.4	0.6	0.04
4	0.6	0.4	0.06
5	0.8	0.2	0.08

A3. Preparación de reactivos para la determinación de polifenoles totales

- **Ácido gálico:** se pesaron 2.5 mg de ácido gálico y se disolvieron en 25 mL agua.

Cuadro A6. Concentración de Ácido Gálico para la curva de calibración en la determinación de Polifenoles Totales.

No	μL tomados Stock de ácido gálico, 100 $\mu\text{g/mL}$	μL agua destilada	Concentración de ácido gálico, $\mu\text{g mL}$
Blanco	0	200	0
1	40	160	20
2	80	120	40
3	120	80	60
4	160	40	80
5	200	0	100