

CAPACIDAD GERMINATIVA Y SU TASA DE DECLINACIÓN EN SEMILLA DE *Lupinus bilineatus* Benth. ALMACENADA 15 AÑOS

GERMINATIVE CAPACITY AND ITS DECLINE RATE IN *Lupinus bilineatus* BENTH. SEED STORED FOR 15 YEARS

Esperanza García-Pascual¹, Dante Arturo Rodríguez-Trejo^{1*}, Enrique Guízar-Nolazco¹, Baldemar Arteaga-Martínez¹

¹División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo, km. 38.5 carretera México-
Texcoco, Chapingo, Estado de México, C.P. 56230. (espe_gp_22@hotmail.com) (tropec@gmail.
com) (barteaga@correo.chapingo.mx) (dantearturo@yahoo.com).

RESUMEN

El género *Lupinus* tiene potencial de uso en restauración ecológica, en sistemas agroforestales y en plantaciones forestales comerciales, por su capacidad de fijar nitrógeno al suelo. Sus semillas presentan latencia física, que permite su almacenamiento por periodos largos; su longevidad se conoce parcialmente. El objetivo del presente estudio fue analizar peso, contenido de humedad, capacidad germinativa, energía germinativa y viabilidad de semillas de *L. bilineatus* Benth. después de almacenarlas 15 años en frasco de vidrio a temperatura ambiente (fresca, aproximadamente 10-15 °C) y sin luz. El diseño experimental fue de bloques completos al azar y el ANDEVA se realizó con un procedimiento mixto. Los tratamientos fueron: testigo, escarificación mecánica (lijado con papel lija) y química (5, 10, 30 y 40 min de inmersión en ácido sulfúrico), con un régimen día/noche de 25/20 °C y fotoperiodo de 12 h (luz fluorescente). Los resultados se compararon con los de 15 años antes. Se obtuvieron: 66 766.2 semillas por kg, con humedad de 6.60% (base en fresco), 45% de viabilidad (prueba con sales de tetrazolio) y energía germinativa de 3.2 d. Entre los tratamientos se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.0001$). La escarificación con papel lija propició la germinación mayor (48.9%). La tasa de declinación anual de capacidad germinativa fue 2.24%. La latencia física que mantiene las semillas podría eliminarse con escarificación. La microscopía de barrido mostró que la cubierta seminal presenta cutícula, macroescleroides, osteoescleroides y parénquima. La semilla de *L. bilineatus* sin cubierta seminal contiene 52.15, 9.21 y 2.83% de proteína cruda, grasa cruda y fibra cruda.

Palabras clave: almacenamiento, cubierta seminal, escarificación mecánica, germinación, latencia física, *Lupinus bilineatus*.

ABSTRACT

The genus *Lupinus* has potential use in ecological restoration, agroforestry systems, and commercial forest plantations, due to its ability to fix nitrogen to the soil. The physical dormancy of its seeds allows their storage for long periods. Its longevity is partially known. The objective of this study was to analyze the weight, moisture content, germinative capacity, germinative energy, and viability of seeds of *L. bilineatus* Benth., after they had been stored for 15 years in a glass jar at room temperature (fresh, approximately 10-15 °C), and without light. A randomized complete block design was used for the experiment and the ANOVA was performed with a mixed procedure. The treatments were: control, mechanical scarification (sanding with sandpaper), and chemical (5, 10, 30, and 40-min immersion in sulfuric acid), with a day/night regime of 25/20 °C, and a 12-h photoperiod (fluorescent light). The results were compared with those obtained 15 years before. The following results were obtained: 66 766.2 seeds per kg, with a 6.60% humidity (fresh basis), 45% viability (tetrazolium salts test), and a 3.2 d germinative energy. There were significant differences among the treatments ($p \leq 0.0001$). Scarification with sandpaper favored a greater germination (48.9%). The annual decline rate of the germinative capacity was 2.24%. Scarification can eliminate the physical dormancy of the seeds. Scanning microscopy showed that the seed coat has cuticle, macrosclereids, osteosclereids, and parenchyma. The seed of *L. bilineatus* without coat contains 52.15, 9.21, and 2.83% raw protein, raw fat, and raw fiber, respectively.

Keywords: storage, seed coat, mechanical scarification, germination, physical dormancy, *Lupinus bilineatus*.

INTRODUCTION

More than 400 species of the genus *Lupinus* are distributed in North and South America (Gross, 1982). In Mexico, *Lupinus* grows on roads, hillsides, degraded forests, and forest

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: febrero, 2019. Aprobado: agosto, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 115-127. 2020.

INTRODUCCIÓN

Más de 400 especies del género *Lupinus* se distribuyen en el norte y sur de América (Gross, 1982). En México, *Lupinus* crece en caminos, laderas de cerros, bosques degradados y ecosistemas forestales desde el nivel del mar, hasta más de 4000 m de altitud (Lagunes *et al.*, 2012); se distribuye de Baja California a Tamaulipas hasta el sur de Chiapas, con la mayor riqueza de especies en la Sierra Madre Occidental y el Eje Neovolcánico Transversal (Ruiz *et al.*, 2006).

El género *Lupinus* tiene gran potencial en la restauración ecológica, en sistemas agroforestales y en plantaciones forestales por su capacidad de fijar nitrógeno al suelo. Las especies del género tienen uso ceremonial, religioso, decorativo, forrajero y alimenticio (Gladstones, 1980; Bello *et al.*, 2015). Sin embargo, como la mayoría de las semillas de leguminosas, presenta una cubierta seminal dura que impide la imbibición, es decir, cuenta con latencia física (Smith *et al.*, 2010) que retarda el proceso germinativo. La presencia de este tipo de latencia en *Lupinus bilineatus* Benth. fue comprobada por Martínez *et al.* (2008), al observar que las semillas germinaron mejor después de recibir tratamientos de escarificación química. Este tipo de latencia permite el almacenamiento de las semillas por periodos extensos.

El tiempo entre la cosecha y la siembra de la semilla de cualquier especie es un aspecto crítico, ya que en este periodo la semilla se va deteriorando y pierde capacidad germinativa, si bien la tasa a la cual esto sucede, es muy variable entre especies. El CATIE (1997) señala que las condiciones de almacenamiento influyen en la tasa de deterioro de la semilla. El almacenamiento tiene la finalidad de mantener la viabilidad de la semilla al nivel más alto por el mayor tiempo posible. La longevidad de las semillas está determinada por su potencial de almacenamiento genético (semillas ortodoxas o recalcitrantes), factores del desarrollo (madurez de la semilla), factores ambientales (contenido de humedad, temperatura, composición de la atmósfera), fisiológico (actividad metabólica de la semilla), y por el daño antes o durante la permanencia en el almacén, así como por la interacción entre estos factores (Navarro, 2003).

Por lo anterior, considerando la importancia de esta especie y las características de su semilla, es relevante investigar la tasa de declinación en la capacidad

ecosistemas, from sea level to more than 4000 masl (Lagunes *et al.*, 2012). It is distributed from Baja California to Tamaulipas, and southern Chiapas; the greatest variety of species can be found in the Sierra Madre Occidental and the Transmexican Volcanic Belt (Ruiz *et al.*, 2006).

As a result of its ability to fix nitrogen to the soil, the genus *Lupinus* has great potential for ecological restoration, in agroforestry systems, and in forest plantations. Its species have ceremonial, religious, decorative, forage, and food uses (Gladstones, 1980; Bello *et al.*, 2015). However, like most leguminous seeds, it has a hard-seed coat that prevents imbibition, *i.e.*, it has physical dormancy (Smith *et al.*, 2010) that slows down the germinative process. Martínez *et al.* (2008) verified the presence of this type of dormancy in *Lupinus bilineatus* Benth., observing that the seeds germinated better after undergoing chemical scarification treatments. This type of dormancy allows seeds to be stored for extended periods.

The time elapsed between the harvest and the sowing of the seed of any species is critical; in this period, the seed gradually deteriorates and loses its germinative capacity, although the rate is very variable between species. CATIE (1997) notes that storage conditions influence the deterioration rate of the seed. The purpose of storage is to maintain the highest level of seed viability for as long as possible. The longevity of the seeds is determined by their genetic storage potential (orthodox or recalcitrant seeds), development factors (seed maturity), environmental factors (moisture content, temperature, atmosphere composition), physiological factor (metabolic activity of the seed), and by the damage undergone before or during their stay in the storage room, as well as by the interaction between these factors (Navarro, 2003).

Therefore, considering the importance of this species and the characteristics of its seed, researching the decline rate in the germinative capacity of *L. bilineatus* seeds stored for 15 years is a relevant objective. The hypothesis was that *L. bilineatus* seeds had not lost their entire viability after that period. The objectives of this study were: 1) to determine the weight, germination, germinative energy, viability, and moisture content of the *L. bilineatus* seed, after it had been stored for 15 years; 2) to establish the decrease rate of weight, viability, moisture content, and germination; 3) to describe the seed coat tissues; and 4) to describe its partial chemical composition.

germinativa de semillas de *L. bilineatus* almacenadas durante 15 años. La hipótesis fue que las semillas de *L. bilineatus* no han perdido la totalidad de su viabilidad después de tal periodo de tiempo. Los objetivos de este estudio fueron: 1) determinar el peso, la germinación, la energía germinativa, la viabilidad y el contenido de humedad de semilla de *L. bilineatus*, almacenada por 15 años; 2) establecer la tasa de disminución del peso, viabilidad, contenido de humedad y germinación; 3) describir los tejidos de la cubierta seminal; y 4) describir su composición química parcial.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó con semillas de *L. bilineatus* recolectadas el 27 de abril del 2002 en una parcela agrícola abandonada en el libramiento de la carretera México-Cuautla, a 1.5 km al NO de la población de Amecameca, Estado de México. Éstas se extrajeron manualmente de las vainas maduras, se limpiaron, y su pureza fue 100%. Las semillas permanecieron almacenadas en dos frascos de vidrio llenados a la mitad aproximadamente, durante 15 años, en el almacén del Laboratorio de Semillas Forestales de la División de Ciencias Forestales (DICIFO), Universidad Autónoma Chapingo (UACH) a temperatura ambiente (fresca) y en oscuridad. Dichos frascos fueron abiertos en dos ocasiones de las que no se registró fecha, pero que contribuyeron a renovar la atmósfera del frasco. No se proporcionó tratamiento alguno a las semillas antes de ser almacenadas.

Análisis de semilla

Para el análisis de la semilla se repitió parte del experimento de Martínez *et al.* (2008), con la finalidad de realizar un comparativo de sus resultados obtenidos en 2002 (si bien los resultados se publicaron 6 años después) y en 2017, 15 años después de recolectar y almacenar las semillas. Para este análisis se siguieron las normas de ISTA (2012) y se consideraron las siguientes pruebas.

El peso se determinó con ocho muestras de 100 semillas cada una, seleccionadas al azar del lote, y se expresó como número de semillas por kilogramo y como el peso de 1000 de ellas. Para determinar el contenido de humedad, se registró el peso fresco de 200 semillas y su peso seco se obtuvo con estufa de secado a 75 °C; el peso se registró cada día hasta ser constante. La fórmula utilizada fue (1):

$$CH_f = (PF - PS / PF) (100) \quad (1)$$

donde, CH_f : contenido de humedad base en fresco. PF : peso fresco. PS : peso seco.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out with *L. bilineatus* seeds collected on April 27, 2002, in an abandoned agricultural plot on the Mexico-Cuautla highway, 1.5 km NW of the town of Amecameca, Estado de Mexico. The seeds were manually extracted from mature pods and cleaned. Their purity was 100%. The seeds were stored in two half-filled glass jars for approximately 15 years, at room temperature (fresh), and in the dark, in the Laboratorio de Semillas Forestales of the División de Ciencias Forestales (DICIFO)-Chapingo Autonomous University (UACH). Those jars were opened two times on unrecorded dates, which contributed to renew their atmosphere. The seeds did not undergo any kind of treatment before being stored.

Seed analysis

For the seed analysis, part of the experiment carried out by Martínez *et al.* (2008) was repeated in order to compare the results they obtained in 2002 with those obtained in 2017, 15 years after the seeds were collected and stored. For this analysis, the ISTA (2012) standards were applied and the following tests were considered.

The weight of eight samples of 100 seeds each, randomly selected, was determined and expressed as the number of seeds per kilogram and as the total weight of 1000 seeds. To determine the moisture content, the fresh weight of 200 seeds was recorded and its dry weight was obtained after the seeds were dried in a drying oven at 75 °C. The weight was recorded every day until it was constant. The formula used was (1):

$$CH_f = (PF - PS / PF) (100) \quad (1)$$

where: CH_f : fresh basis moisture content. PF : fresh weight. PS : dry weight.

The viability test was applied with salts of triphenyl tetrazolium chloride (1%); 100 halves of 100 seeds were immersed and soaked in this solution; they were left 24 h in the dark (covered with aluminum foil), at 25 °C, in a controlled environment chamber. Model (2) was used to determine the viability. Additionally, the traditional water flotation test was used for 24 h to find out the viability. For this method—which is suitable for medium or large sized seeds—the seeds are placed in a container full of water; denser seeds sank and were considered viable, while those that floated were considered non-viable.

$$V = (SV / T) (100) \quad (2)$$

La prueba de viabilidad se aplicó con sales de cloruro de tri-fenil tetrazolio al 1%, para lo cual se remojaron 100 mitades de 100 semillas inmersas en dicha solución, en oscuridad (cubiertas con papel aluminio) y a 25 °C en cámara de ambiente controlado durante 24 h. Para determinar la viabilidad se utilizó el modelo (2). También se obtuvo la viabilidad mediante el método tradicional de la prueba de flotación en agua durante 24 h. En este método, adecuado para semillas de tamaño mediano o grandes, las semillas se ponen en un recipiente lleno de agua y las que se van al fondo, más densas, se consideran viables, mientras que las que permanecen flotando se consideran no viables.

$$V=(SV/T) (100) \quad (2)$$

donde, V : viabilidad. SV : número de semillas viables. T : número total de semillas.

Prueba de germinación

El experimento se efectuó en el Laboratorio de Semillas Forestales de la DICIFO, en la UACH, en una cámara de ambiente controlado marca Conviron[®], programada con un régimen de temperatura (día/noche) de 25/20 °C, con un fotoperiodo de 12 h y luz fluorescente. La siembra se realizó en tela fieltro, dentro de cajas de plástico con retícula plástica en la base. Las cajas se desinfectaron previamente con cloro al 1%. El riego se realizó en una sola ocasión con 250 mL de agua destilada y solución de Captán al 2%. El registro de la germinación se realizó diario, hasta que ya no la hubo. El criterio para contabilizar las semillas germinadas, fue considerar aquellas en donde su radícula alcanzó una longitud igual a la de semilla. La energía germinativa se consideró como el número de días para alcanzar el 75% de la germinación final. A partir del estudio inicial (Martínez *et al.*, 2008) y los valores obtenidos para el presente estudio, se calculó una tasa de declinación anual para las variables de: peso, contenido de humedad base en fresco, viabilidad y capacidad germinativa.

Diseño experimental

El diseño experimental fue bloques completos al azar, con seis bloques y los tratamientos fueron seis: dos condiciones de escarificación, la mecánica (con papel lija, lijando un costado de la semilla hasta que se apreciaba el interior) y la química (remojo en ácido sulfúrico al 98% durante 5, 10, 30 y 40 min de inmersión), y un testigo. Por cada unidad experimental se usaron 30 semillas con seis repeticiones para cada combinación de niveles de los factores, para un subtotal de 180 semillas por tratamiento y un total de 1080 semillas en el experimento.

where: V : viability. SV : number of viable seeds. T : total number of seeds.

Germination test

The experiment was carried out at the Laboratorio de Semillas Forestales of the DICIFO-UACH, in a Conviron[®] controlled environment chamber, programmed with a temperature regime (day/night) of 25/20 °C, with a 12-h photoperiod and fluorescent light. The seeds were sown on felt cloth, inside plastic boxes with plastic grids at the base. The boxes were previously disinfected with 1% chlorine. Irrigation was done only once with 250 mL of distilled water and a 2% Captan solution. Germination was recorded daily, until it stopped. The criterion for counting the germinated seeds was to include those whose radicle reached a length equal to that of their seed. Germinative energy was considered as the number of days needed to reach 75% of the final germination. Based on the initial study (Martínez *et al.*, 2008) and the values obtained in the present study, an annual decline rate was calculated for the following variables: weight, fresh basis moisture content, viability, and germinative capacity.

Experimental design

A randomized complete block designed was used for the experiment, with six blocks and six treatments: mechanic scarification (one side of the seed was sanded with sandpaper until the interior could be seen), chemical scarification (soaking in 98% sulfuric acid during 5, 10, 30, and 40 min), and a control. For each experimental unit, 30 seeds with six replicates were used for each combination of factor levels; a subtotal of 180 seeds per treatment was utilized, and a grand total of 1080 seeds was sown for the whole experiment.

Statistical model

The statistical model was as follows:

$$Y_{ij}=\mu+\alpha_i+\beta_j+\varepsilon_{ij} \quad (3)$$

where: μ : general mean. α_i : effect of the i -th level of the scarification treatment, with fixed effects. β_j : effect of the j -th block, with random effects. ε_{ij} : experimental error.

Statistical analysis

The analysis of variance was performed using the mixed procedure (Proc Mixed) of the SAS statistical software for microcomputers. The effects of the treatments were considered

Modelo estadístico

El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad (3)$$

donde, μ : media general. α_i : efecto del i -ésimo nivel del tratamiento escarificador, con efectos fijos. β_j : efecto del j -ésimo bloque, con efectos aleatorios. ε_{ij} : error experimental.

Análisis estadístico

El análisis de varianza se realizó con el procedimiento mixto (Proc Mixed) del programa SAS[®] para microcomputadoras. Los efectos de los tratamientos se consideraron fijos, y los de los bloques aleatorios. Dado que la germinación (G) es una variable binomial, se transformó con la función arco seno. La comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Descripción de la cubierta seminal

Para realizar la descripción de las capas de la cubierta seminal se cortaron cinco semillas, sin haberles aplicado tratamiento alguno, y se utilizó la muestra donde se apreciaban con más detalle las capas. Para obtener microfotografías, se usó un microscopio electrónico de barrido (FEI Quanta 450) para analizar la muestra por microscopía de barrido, modalidad ambiental, en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal (LANISAF), de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH).

Análisis químico proximal

En 2017 se realizó un análisis proximal de las semillas de *L. bilineatus* (recolectada en 2002 y almacenada por 15 años) y *L. montanus* Kunth. (recolectada en 2015 y almacenada por dos años) en el Laboratorio de Nutrición Animal, Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia, UACH. Para ello se requirieron 25 g de semillas, sin cubierta seminal, de cada especie. Se usó la metodología de AOAC (1975).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de semillas

El peso de la semilla fue 65 659.9 semillas kg^{-1} y en promedio el peso de 1000 semillas fue de 14.97 g; el contenido de humedad fue 6.6%; la viabilidad alcanzó 45% con la prueba de sales de tetrazolio y 98% con la de flotación. De acuerdo con Martínez *et al.* (2008), 15

fixed, and those of the blocks, randomized. Since germination (G) is a binomial variable, it was transformed using the arc-sine function. The means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$).

Description of the seed coat

To describe the layers of the seed coat, five seeds without any treatment were cut, and the sample with the most detailed layers was used. A scanning electron microscope (FEI Quanta 450) —capable of obtaining photomicrographs— was used to analyze the sample using its environmental modality, at the Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal (LANISAF)- Universidad Autónoma Chapingo (UACH).

Proximate chemical analysis

In 2017, a proximate analysis was carried out with seeds of *L. bilineatus* (collected in 2002 and stored for 15 years) and *L. montanus* Kunth. (collected in 2015 and stored for two years), at the Laboratorio de Nutrición Animal, Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia-UACH. For this purpose, 25 g of seeds —without seed coat— of each species were required. The AOAC (1975) methodology was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of seeds

The seed weighed 65 659.9 seeds kg^{-1} , and the average weight of 1000 seeds was 14.97 g; the moisture content was 6.6%; the viability reached 45% with the tetrazolium salts test and 98% with the flotation test. According to Martínez *et al.* (2008), the values obtained 15 years before were 66 666.7 seeds kg^{-1} , 15.0 g, 6.6%, 98%, and 100%, respectively; therefore, out of all these variables, there was only a significant reduction in viability, according to the tetrazolium salts test.

Germination

The analysis of variance showed significant differences ($p \leq 0.0001$) in germination between treatments (Table 1). The treatment with the highest germination after the seed had been stored for 15 years was scarification with sandpaper (48.9%, Figure 1). The control only reached a 22.2% germination.

When mechanical scarification was applied, the seeds of *L. bilineatus* began to germinate 24 h after

años antes estos valores fueron 66 666.7 semillas kg^{-1} , 15.0 g, 6.6%, 98% y 100%, respectivamente, por lo cual de todas esas variables solo hubo una reducción relevante en la viabilidad, conforme a la prueba con sales de tetrazolio.

Germinación

El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($p \leq 0.0001$) en la germinación entre tratamientos (Cuadro 1). El tratamiento con la mayor germinación luego de 15 años de almacenamiento de la semilla, fue escarificación con papel lija (48.9%, Figura 1). El testigo solo alcanzó 22.2% de germinación.

sowing; this result matches the findings of Sánchez *et al.* (2016) in seeds of *Caesalpinia platyloba* S. Watson, which underwent the same scarification treatment. The seeds of the control of the studied species started to germinate at 2.7 d. These results show that even after a long period of storage, the seeds of *L. bilineatus* maintain their physical dormancy, so they must be scarified to allow them to germinate. Mechanical scarification gives excellent results with species that have physical dormancy (Rossini *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2014; Atencio *et al.*, 2003).

Martínez *et al.* (2008) found that the best treatment for the *L. bilineatus* seed collected and studied in 2002 was to immerse it in sulfuric acid for 30 and

Cuadro 1. Resultados de comparación de medias para la capacidad germinativa de *Lupinus bilineatus* con tratamientos de escarificación y 15 años almacenada.

Table 1. Results of comparing the means of the germinative capacity of *L. bilineatus* with scarification treatments and 15-years storage.

Tratamiento	Media (%)
Escarificación con lija	48.90 a
Escarificación con H_2SO_4 por 30 min	26.12 b
Escarificación con H_2SO_4 por 40 min	23.88 b
Testigo	22.22 b
Escarificación con H_2SO_4 por 10 min	19.45 b
Escarificación con H_2SO_4 por 5 min	13.88 b

Medias con letra diferente letra son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). ❖
Means with different letter are statistically different ($p \leq 0.05$).

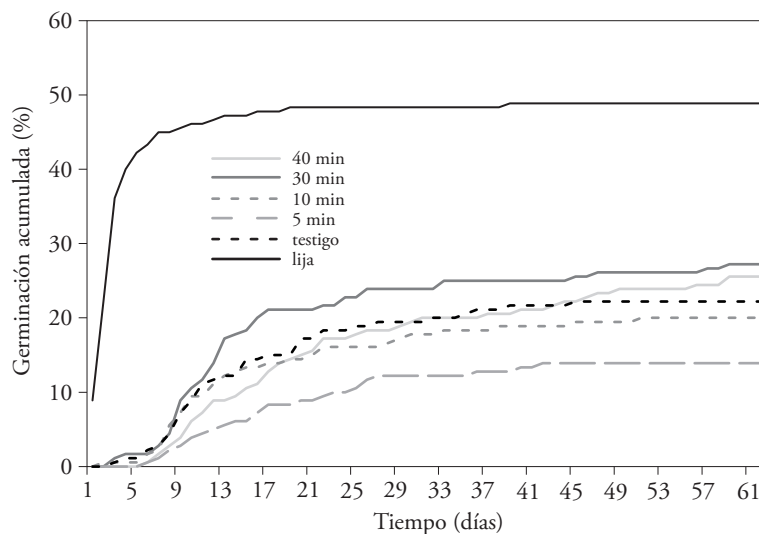


Figura 1. Germinación diaria acumulada de *Lupinus bilineatus* con seis tratamientos aplicados y 15 años de almacenamiento.

Figure 1. Cumulative daily germination of *Lupinus bilineatus* with six treatments applied and 15 years of storage.

Las semillas de *L. bilineatus* comenzaron a germinar 24 h después de sembradas cuando se les aplicó escarificación mecánica, resultado que coincide con el de Sánchez *et al.* (2016) en semillas de *Caesalpinia platyloba* S. Watson, con el mismo tratamiento escarificador. Las semillas del testigo de la especie estudiada tardaron 2.7 d en iniciar la germinación. Estos resultados demuestran que incluso después de un largo periodo de almacenamiento, las semillas de *L. bilineatus* mantienen su latencia física, por lo que deben ser escarificadas para hacerlas germinar. La escarificación mecánica da excelentes resultados con especies que tienen latencia física (Rossini *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2014; Atencio *et al.*, 2003).

Martínez *et al.* (2008) encontraron que el mejor tratamiento para la semilla de *L. bilineatus* recolectada y estudiada en 2002 fue la inmersión en ácido sulfúrico por 30 y 40 min, con una germinación de 82%. Después de ser almacenada 15 años, la germinación con los mismos tratamientos fue 26.1% y 23.9%, respectivamente, sin diferencias significativas respecto al testigo. Esta diferencia puede obedecer al deterioro en una porción de las semillas y, en consecuencia, a una latencia menos intensa luego del almacenamiento, aunque el resto de ellas preserve su latencia física poco alterada. Lo anterior puede causar las diferencias observadas en los resultados de tratamientos escarificatorios entre semilla fresca y semilla almacenada durante 15 años.

En el testigo de Martínez *et al.* (2008) se registró una mayor capacidad germinativa (42.5%), que en nuestra investigación (22.2%), lo que denota la reducción en tal capacidad.

Energía germinativa

También se observaron diferencias estadísticamente significativas en la energía germinativa ($p \leq 0.0003$) (Cuadro 2). De manera similar a la germinación, luego de 15 años de almacenamiento de la semilla, la mayor energía germinativa (menor número de días para alcanzar 75% de la capacidad germinativa), fue para la escarificación con lija (3.2 d), aunque en este caso no hubo diferencias con la escarificación química por 30 min. Martínez *et al.* (2008) obtuvieron los mayores valores de energía germinativa para los tratamientos escarificatorios en ácido sulfúrico por 20 y 30 min, con 1.5 y 1.7 d respectivamente. Este resultado evidencia una mengua en la energía germinativa.

40 min; the result reached was 82% germination. After being stored for 15 years, germination with those treatments was 26.1% and 23.9%, respectively, without significant differences with regard to control. This difference may be the result of the deterioration of a portion of the seeds and, consequently, of a less intense post-storage dormancy, although the rest of them preserved their slightly altered physical dormancy. This can cause the differences observed in the results of scarification treatments between fresh seed and seed stored for 15 years.

The control used by Martínez *et al.* (2008) had a greater germinative capacity (42.5%) than the one used in our research (22.2%), which indicates the reduction of that ability.

Germinative energy

Statistically significant differences in germinative energy were also observed ($p \leq 0.0003$) (Table 2). Just like with germination, after the seeds had been stored for 15 years, the highest germinative energy—least number of days required to reach a 75% germinative capacity—was obtained with scarification with sandpaper (3.2 d), although in this case there were no differences when seeds were subject to chemical scarification for 30 min. Martínez *et al.* (2008) obtained the highest germinative energy values with scarification treatments in sulfuric acid for 20 and 30 min, with 1.5 and 1.7 d, respectively. This result proves a decrease in germinative energy.

Decline rates of germinative capacity

Considering the different germination results between this research and that the one carried out by Martínez *et al.* (2008) 15 years earlier, and assuming a linear decline, the germinative capacity of the seed decreased by 2.24% for each year of storage. Under the storage conditions of our study, we estimate that the seeds will no longer germinate 36 years after they were collected (Figure 2). The annual decline rates for the other variables were: seed weight, 0.2%; fresh basis moisture content, 0%; and viability (tetrazolium salts test), 3.53%. In our study, the reduction is assumed to be linear in the case of germination and the other characteristics that have changed over time, although the tendency to fall may not be direct.

Cuadro 2. Comparación de medias para la energía germinativa de semilla de *Lupinus bilineatus* almacenada durante 15 años.

Table 2. Comparison of means for the germinative energy of *L. bilineatus* seed stored for 15 years.

Tratamiento	Media (d)
Escarificación con H ₂ SO ₄ por 40 min	24.8 a
Escarificación con H ₂ SO ₄ por 5 min	21.6 a
Escarificación con H ₂ SO ₄ por 10 min	19.3 a
Testigo	17.0 a
Escarificación con H ₂ SO ₄ por 30 min	13.5 ab
Escarificación con lija	3.2 b

Medias con diferente letra son estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). ❖
 Means with different letter are statistically different ($p \leq 0.05$).

Tasas de declinación de la capacidad germinativa

Al considerar la diferencia entre la germinación encontrada en esta investigación y la obtenida por Martínez *et al.* (2008) 15 años antes, asumiendo una declinación lineal, se mostró que cada año de almacenamiento la semilla redujo 2.24% su capacidad germinativa. En las condiciones de almacenamiento de nuestro estudio se estima que después de 36 años de su recolección las semillas ya no germinarán (Figura 2). Las tasas de declinación anual para las otras variables fueron: peso de semillas, 0.2%; contenido de humedad base en fresco, 0%; viabilidad (prueba

For this study, there was no strict control of the environmental factors of the storage, although the environment was kept fresh and dry. Pérez *et al.* (2012) compared the storage conditions of seeds of *Physalis iocarpa* Brot. ex Hornem., and found that —when high temperatures (23.8 °C) are combined with high relative humidity (81.4%)—, the germinative capacity, viability, respiration rate, and emergence speed of aerial and radicle parts were reduced, after they have been stored for 8 months. Willan (1991) points out that the longevity of orthodox forest seeds (like those studied here) increases when they are stored at approximately 0 °C, as a consequence of their reduced metabolism.

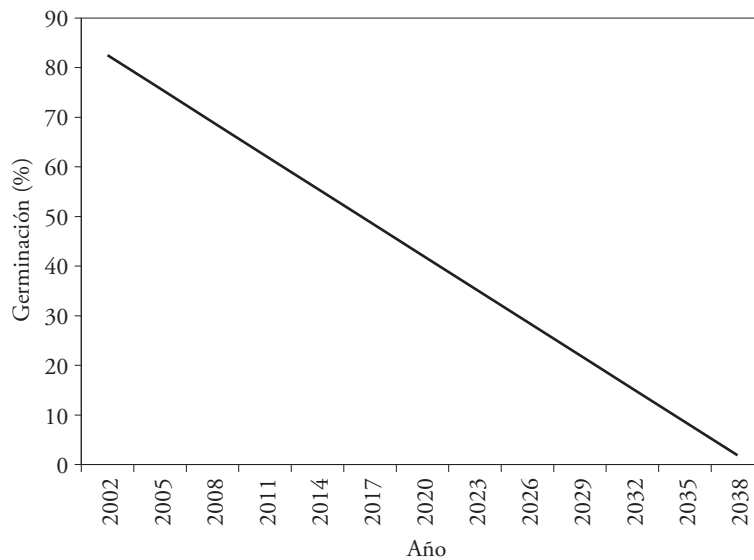


Figura 2. Reducción en la capacidad germinativa de *Lupinus bilineatus* (semilla recolectada hacia 2002). Se asume una tendencia lineal.

Figure 2. Reduction in the germinative capacity of *L. bilineatus* (seed collected in 2002). A linear trend is assumed.

con sales de tetrazolio), 3.53%. En nuestro estudio se asume que la reducción es lineal en la germinación y las demás características que se modificaron a través del tiempo, aunque la tendencia de caída podría no ser directa.

Para este estudio no hubo un control estricto de los factores ambientales del almacenamiento, si bien el ambiente fue fresco y seco. Pérez *et al.* (2012) compararon las condiciones de almacenamiento en semillas de *Physalis iocarpa* Brot. ex Hornem., y encontraron que cuando la temperatura alta (23.8 °C) se combina con alta humedad relativa (81.4%) se reducen capacidad germinativa, viabilidad, tasa de respiración, velocidad de emergencia de parte aérea y de radícula, a los 8 meses de almacenamiento. Willan (1991) señala el aumento en la longevidad de las semillas forestales ortodoxas (como las aquí estudiadas), cuando se almacenan a temperaturas en torno a 0 °C, pues se reduce su metabolismo. Por ello, este último tipo de almacenamiento pudiera incrementar la longevidad y reducir la declinación en la capacidad germinativa de *L. bilineatus*. Estrada *et al.* (2005) encontraron en la semilla de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) que, debido a la influencia del tiempo de almacenamiento y factores de almacenamiento (temperatura, humedad relativa), se produjo una disminución en su peso y en sus componentes (almendra, aceite, torta y residuo). Pero la reducción en peso no la observamos en *L. bilineatus*.

En especies arbóreas de la familia Fabaceae, el almacenamiento en condiciones ambientales no limita significativamente la viabilidad de sus semillas. Timyan (1996) afirmó que las semillas de *Acacia farnesiana* (L.) Willd. pueden permanecer viables por 30 años o más a temperatura ambiental, y González *et al.* (1998) reportaron que las de *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham pueden conservarse más de 12 años con una viabilidad aceptable. Pero *Calliandra calothyrsus* Meisn. la mantiene solo por 12 meses (Powell, 1997), y *Mimosa scabrella* Benth. y *Prosopis tamarugo* F. Phil pueden permanecer viables por 3 y 2 años, respectivamente (CATIE, 2000).

Descripción de la cubierta seminal

Los cortes de la cubierta seminal de *L. bilineatus* mostraron las siguientes capas (del exterior al interior): cutícula, con apariencia cerosa; macroescleridas, con células verticales largas, estrechas; osteoescleridas, con

Therefore, this last type of storage could increase the longevity and reduce the decline of the germinative capacity of *L. bilineatus*. Estrada *et al.* (2005) found a decrease in the weight and components (kernel, oil, press cake, and residue) of the neem seed (*Azadirachta indica* A. Juss), as a result of the influence of storage time and storage factors (temperature, relative humidity). However, the reduction in weight was not observed in *L. bilineatus*.

In tree species of the Fabaceae family, storage under environmental conditions does not significantly limit the viability of its seeds. Timyan (1996) stated that the seeds of *Acacia farnesiana* (L.) Willd. can remain viable for 30 years or more at room temperature; and González *et al.* (1998) reported that *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham seeds can be preserved for more than 12 years with acceptable viability. However, *Calliandra calothyrsus* Meisn. only remains viable for 12 months (Powell, 1997); meanwhile, *Mimosa scabrella* Benth. and *Prosopis tamarugo* F. Phil can remain viable for 3 and 2 years, respectively (CATIE, 2000).

Description of the seed coat

The cuts of the seed coat of *L. bilineatus* showed the following layers (from outwards to inwards): cuticle, with waxy appearance; macrosclereids, with long, narrow vertical cells; osteoesclereids, with intercellular spaces; and finally a layer of parenchymal cells, as can be seen in Figures 3, 4, and 5. Under this last layer there is a seed cavity which is not always evident; it is followed by the embryo cotyledons that occupy most of that cavity. The anatomy of the seed coat was similar to that of various legumes, as Perissé and Tourn (2014) report for seeds of *Vicia dasycarpa* Ten. Cv. Tolse F. C., and as Leython and Jáuregui (2008) found in five species of *Calliandra*.

Proximate chemical analysis

The amount of reserves was mainly determined based on the cotyledons, which occupy most of the seed cavity in the species of the genus. The *L. montanus* seed —collected 2 years before— and the seed of *L. bilineatus* —stored for 15 years— were compared. No lower levels were observed in any indicator at 15 years with respect to seeds of another species of *Lupinus* collected in a more recent date.

espacios intercelulares; y finalmente una capa de células parenquimatosas, como se observa en la Figuras 3, 4 y 5. Bajo esta última capa hay una cavidad seminal no siempre evidente, a la cual siguen los cotiledones del embrión que ocupan la mayor parte de tal cavidad. La anatomía de la cubierta fue similar a la de diversas leguminosas, como Perissé y Tourn (2014) reportan para semillas de *Vicia dasycarpa* Ten. Cv. Tolse F.C.

Some indicators were even higher in stored seed (Tables 3 and 4). The results of the proximate analysis are similar to those obtained by Pablo *et al.* (2015) and Juárez *et al.* (2018) in seeds of four species of *Lupinus* (*L. campestris* Cham. & Schltdl., *L. exaltatus* Zucc., *L. hintonii*, and *L. montanus*) collected in the Transmexican Volcanic Belt, with protein contents from 32.5 to 57.5 g 100 g⁻¹. High levels of protein

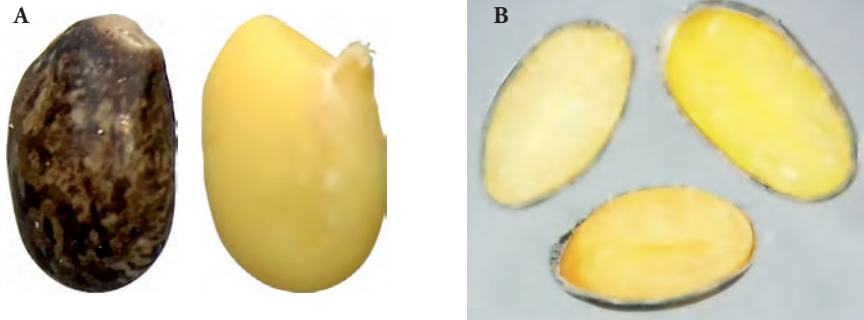


Figura 3. Semillas de *Lupinus bilineatus*. A. Con y sin cubierta seminal. B. Cortes longitudinales de semillas. Fotos A y B por Esperanza García Pascual.

Figure 3. Seeds of *L. bilineatus*. A. With and without seed coat. B. Longitudinal cuts of seeds. Photos A and B by Esperanza García Pascual.

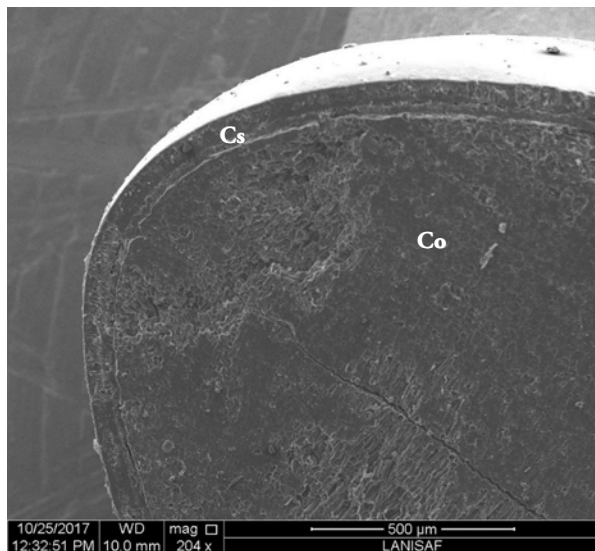


Figura 4. Corte longitudinal y vista en microscopio electrónico de barrido de la semilla de *Lupinus bilineatus*: Cs, cubierta seminal; Co, cotiledones. Microfotografía por Luis Alejandro Ortega Aragón (LANISAF). Identificación de partes por los autores.

Figure 4. Longitudinal cut and scanning electron microscope view of *L. bilineatus* seed: Cs, seed coat; Co, cotyledons. Photomicrograph by Luis Alejandro Ortega (LANISAF). Identification of parts by the authors.

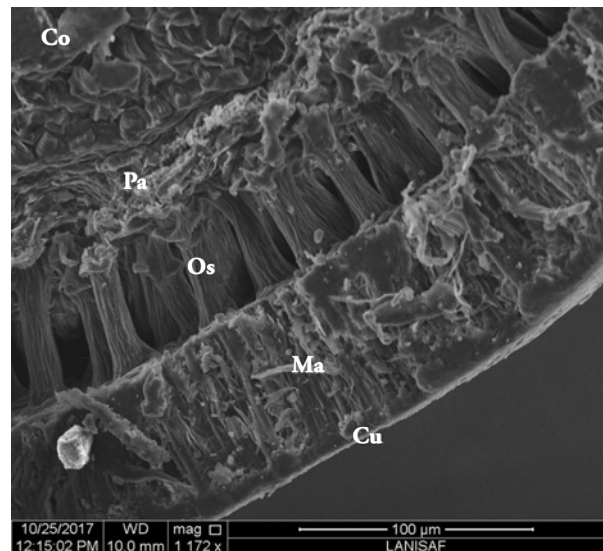


Figura 5. Capas de la cubierta seminal de *Lupinus bilineatus*: Cu, cutícula; Ma, macrosclereidas; Os, osteosclereidas; Pa, parénquima. Co marca los cotiledones. Microfotografía por Luis Alejandro Ortega Aragón (LANISAF). Identificación de capas por los autores.

Figure 5. Layers of the seed coat of *L. bilineatus*: Cu, cuticle; Ma, macrosclereids; Os, osteosclereids; Pa, parenchyma. Co marks the cotyledons. Photomicrograph by Luis Alejandro Ortega Aragón (LANISAF). Identification of layers by the authors.

y como Leython y Jáuregui (2008) hallaron en cinco especies de *Calliandra*.

Análisis químico proximal

La cantidad de reservas se determinó principalmente de los cotiledones, que ocupan la mayor parte de la cavidad seminal en las especies del género, y se comparó la semilla recolectada 2 años antes de *L. montanus* y la semilla de *L. bilineatus* almacenada durante 15 años. No se apreciaron niveles menores en ningún indicador a los 15 años con respecto a la semilla recolectada más recientemente, de otra especie de *Lupinus*. Incluso, algunos indicadores resultaron mayores en la semilla almacenada (Cuadros 3 y 4). Los resultados obtenidos en el análisis proximal son similares a los observados por Pablo *et al.* (2015) y Juárez *et al.* (2018), en semillas de cuatro especies de *Lupinus* (*L. campestris* Cham. & Schltdl., *L. exaltatus* Zucc., *L. hintonii* y *L. montanus*) de la

have been found in wild *Lupinus* seeds from other regions of Mexico (Ruiz *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2009, and Güemes *et al.*, 2012). The protein content of the seed of *L. bilineatus* is relevant if we take into consideration the storage period, since, according to Walters *et al.* (2005), physiological changes occur in cell tissues as a consequence of dehydration. These changes are associated with the physiological aging of the seed, because it loses nutritional reserves (such as proteins and non-reducing sugars) due to respiration, while reducing sugars and increasing free fatty acids (Palma *et al.*, 2000). The fat content was higher than the one observed in the four abovementioned *Lupinus* species (6.5 to 10.1 g 100 g⁻¹). The content of protein nutrient, beneficial fatty acids, and fiber of *Lupinus* is comparable to that of soy (*Glycine max* L.) for animal and human feeding (40.5 to 50 g 100 g⁻¹) (Kohajdová *et al.*, 2011), although the *Lupinus* seed has lupanin, a toxic agent that produces lupinosis in cattle (Aguilar and Zoya, 1982).

Cuadro 3. Análisis químico proximal de semillas de *Lupinus bilineatus* (15 años de almacenamiento).

Table 3. Proximate chemical analysis of *L. bilineatus* seeds (15 years of storage).

Fracción de análisis	Base en fresco	Base en seco
Contenido de humedad (%)	7.96	0.00
Materia seca (%)	92.04	100.00
Cenizas (%)	3.77	4.10
Materia orgánica (%)	88.27	95.90
Proteína cruda (%)	48.00	52.25
Extracto etéreo (grasa cruda) (%)	8.48	9.21
Fibra cruda (%)	2.60	2.83
Extracto libre de nitrógeno (%)	29.18	31.71

Base en fresco: Base como se ofrece la muestra para el análisis. Base anhidra: sin humedad, después de secar a 100 °C. ❖ Fresh basis: Basis as the sample is offered for analysis. Anhydrous basis: no moisture, after drying at 100 °C.

Cuadro 4. Resumen de análisis proximal de *Lupinus montanus* (2 años de almacenamiento).

Table 4. Summary of the proximate analysis of *L. montanus* (2 years of storage).

Fracción de análisis	Base en fresco	Base en seco
Contenido de humedad (%)	8.78	0.00
Materia seca (%)	91.22	100.00
Cenizas (%)	6.03	6.61
Materia orgánica (%)	85.19	93.39
Proteína cruda (%)	49.21	53.95
Extracto etéreo (grasa cruda) (%)	12.05	13.21
Fibra cruda (%)	2.06	2.26
Extracto libre de nitrógeno (%)	21.87	23.98

Faja Volcánica Transmexicana, con contenidos de proteína de 32.5 a 57.5 g 100 g⁻¹. En semillas de *Lupinus silvestres* de otras regiones de México se han encontrado altos contenidos de proteína (Ruiz *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2009 y Güemes *et al.* 2012). El contenido de proteína en la semilla de *L. bilineatus* es relevante por el periodo de almacenamiento, ya que según Walters *et al.* (2005), con la deshidratación ocurren cambios fisiológicos en los tejidos celulares. Dichos cambios están asociados al envejecimiento fisiológico de la semilla, porque pierde reservas nutritivas debido a la respiración, como proteínas y azúcares no reductores, en tanto que los azúcares reductores y ácidos grasos libres aumentan (Palma *et al.*, 2000). El contenido de grasas fue superior al observado en las cuatro especies de *Lupinus* ya señaladas (6.5 a 10.1 g 100 g⁻¹). El contenido de nutrientes proteínicos y ácidos grasos benéficos y fibra de *Lupinus* son comparables a los de la soya (*Glycine max* L.) para alimentación animal y humana (40.5 a 50 g 100 g⁻¹) (Kohajdová *et al.*, 2011), aunque la semilla de *Lupinus* tiene lupanina, un agente tóxico que produce lupinosis en el ganado (Aguilar y Zoya, 1982).

CONCLUSIONES

Después de 15 años de almacenamiento, las semillas de *Lupinus bilineatus* siguen viables y con latencia física, pero con disminución anual de la capacidad germinativa.

El almacenamiento por 15 años de las semillas puede modificar la eficiencia de algunos tratamientos pregerminativos para eliminar la latencia física. Los tratamientos pregerminativos químicos tienen efecto diferente en semillas jóvenes que en semillas almacenadas.

La prueba de flotación para establecer la viabilidad, en semilla almacenada por varios años, no es confiable, pues parte de ésta se sumerge aunque ya no sea viable. Por lo tanto, es mejor aplicar otro tipo de pruebas, como la de sales de tetrazolio.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, por el apoyo financiero y de laboratorios (Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal, Laboratorio de Nutrición Animal, DEISZ, y Laboratorio de Semillas Forestales, Dicifo); a Gerardo

CONCLUSIONS

After 15 years of storage, the seeds of *Lupinus bilineatus* remain viable and physically dormant, although their germinative capacity faces an annual decrease.

Seed storage for 15 years can modify the efficiency with which some pregerminative treatments eliminate physical dormancy. Chemical pregerminative treatments have a different effect on young seeds than on stored seeds.

In seeds stored for several years, the flotation test is not reliable for determining their viability, since some of them sink, even when they are no longer viable. Therefore, it is better to apply other types of tests, such as tetrazolium salts.

—End of the English version—



Mendoza Ángeles y Leopoldo Rosas García, por su apoyo en el trabajo de laboratorio; a Luis Alejandro Ortega Aragón, por la obtención de las microfotografías (LANISAF).

LITERATURA CITADA

- Aguilar C., A., y C. Zoya. 1982. Plantas Tóxicas de México. Instituto Mexicano del Seguro Social. México. 271 p.
- Álvarez A., C., L. Barradas S., O. Barradas S., and G. Williams. L. 2014. Soil seed bank, seed removal, and germination in a seasonally dry tropical forest in Veracruz, México. Bot. Sci. 92: 111-121.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). 1975. Official Methods of Analysis. Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D. C. 832 p.
- Atencio, L., R. Colmenares, M. Ramírez V., y D. Marcano. 2003. Tratamientos pregerminativos en acacia San Francisco (*Peltophorum pterocarpum*) Fabaceae. Rev. Fac. Agron. 20: 63-71.
- Bello G., M. A., S. Hernández M., M. B. N. Lara C., y R. Salgado G. 2015. Plantas útiles de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. Polibotánica 39: 175-215.
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 1997. Secado, Procesamiento y Almacenamiento de Semillas Forestales. CATIE. Serie Técnica. Manual Técnico 24. Turrialba, Costa Rica. 140 p.
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 2000. Manejo de Semillas de 100 Especies de América Latina. Vol. 1. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza Serie Técnica. Manual Técnico 41. Turrialba, Costa Rica. 204 p.

- Estrada O., J., M. T. Díaz L., B. Castillo R., y V. Díaz, F. 2005. Variación del peso de la semilla de Nim y sus componentes durante su almacenamiento. *Rev. Fac. Cienc. Agr* 27: 81-86.
- Gladstones, J. S. 1980. Recent developments in the understanding, improvement, and use of *Lupinus*. In: Summerfield, R. J., and A. H. Bunting (eds). *Advances in Legume Science*. Royal Botanic Gardens. Kew, Richmond. pp: 603-611.
- González, Y., A. Hernández, y F. Mendoza. 1998. Comportamiento de la semilla de leguminosas arbustivas. i. *Leucaena leucocephala* cv. Cunningham. In: *Memorias III Taller Internacional Silvopastoril Los árboles y arbustos en la ganadería*. EEPF Indio Hatuey. Matanzas, Cuba. pp: 107.
- Gross, R. 1982. El Cultivo y la Utilización del Tarwi: *Lupinus mutabilis* Sweet. *Producción y Protección Vegetal* 36. FAO. Roma, Italia. 236 p.
- Güemes, V. N., H. J. Martínez, J. F. Hernández C., J. Yáñez F., and A. Totosaus. 2012. Comparison of chemical composition and protein digestibility, carotenoids, tannins and alkaloids content of wild *Lupinus* varieties flour. *Pak. J. Nut.* 11: 676-682.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2012. International rules for seed testing, ed. 2012. ISTA. Baasendorf, Switzerland.
- Jiménez M., C., R. Campos M., M. E. Sánchez E., A. Jiménez A., G. Gutiérrez L., and G. Dávila O. 2009. Microstructural changes in *Lupinus campestris* seed in response to three thermal debittering treatments. *J. Sci. Food Agric.* 89: 2399-2404.
- Juárez F., B., L. C. Lagunes E., A. Bucio G., A. Delgado A., J. Pérez F., y J. López U. 2018. Efecto de tratamientos hidrotérmico, remojo y germinación en la composición química de semillas de *Lupinus* silvestres. *Agroproduktividad* 11: 41-47.
- Kohajdová, Z., J. Karovicova, and S. Schmidt. 2011. Lupin composition and possible use in Bakery-A review. *Czech J. Food Sci.* 29: 203-211.
- Lagunes E., L. del C., J. López, U., E. García, L., J. Jasso, M., A. Delgado A., y G. García de los S. 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.
- Leython, S., y D. Jáuregui. 2008. Morfología de la semilla y anatomía de la cubierta seminal de cinco especies de *Calliandra* (Leguminosae-Mimosoideae) de Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 56: 1075-1086.
- Martínez, J. M., D. A. Rodríguez, T., Guízar N., E., y R. Bonilla B. 2008. Escarificación artificial y natural de la semilla de *Lupinus bilineatus* Benth. *Rev. Chapingo. Ser. Cienc. Forest. Amb.* 14: 73-79.
- Navarro, M. 2003. Desempeño fisiológico de las semillas de árboles leguminosos de uso múltiple en el trópico. *Pastos y Forrajes* 26: 97-114.
- Pablo P., M., L. C. Lagunes E., J. López U., E. M. Aranda I., y J. Ramos J. 2015. Composición química de especies silvestres del género *Lupinus* del estado de Puebla, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 38: 49-55.
- Palma R., M. P., A. López H., y J. C. Molina M. 2000. Condiciones de almacenamiento y germinación de semillas de *Cenchrus ciliaris* L. y *Andropogon gayanus* Kunth. *Agrociencia* 34: 41-48.
- Pérez C., I., V. A. González H., O. J. Ayala G., J. A. Carrillo S., G. García de los S., A. Peña L., y E. Cruz C. 2012. Calidad fisiológica de semillas de *Physalis ixocarpa* en función de madurez a cosecha y condiciones de almacenamiento. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3: 67-78.
- Perissé, P., y G. M. Tourn. 2014. Morfología de la semilla, presencia de aréolas y entrada de agua en la imbibición de *Vicia dasycarpa* Ten. Cv. Tolse F.C.A. *Phyton* 84: 184-189.
- Powell, H. 1997. *Calliandra calothyrsus* Production and Use. A Field Manual. Winrock International Institute for Agricultural Development. Arkansas, USA. 62 p.
- Rossini O., S., B. Valdés, M. C. Andrés, F. Márquez C., y M. Bueso L. 2006. Germinación de las semillas en algunas especies americanas de Fabaceae y Bignoniaceae cultivadas en Sevilla (SO España). *Lagasalia* 26: 119-129.
- Ruiz L., M. A., R. Rodríguez M., y S. Navarro P. 2006. Evaluación químico- nutricional de *Lupinus exaltatus* Zucc., del Nevado de Colima, México, como fuente potencial de forraje. *Interciencia* 31: 758-761.
- Sánchez S., B. H., E. Pacheco A., Á. Reyes O., G. A. Lugo G., P. Casillas A., y C. P. Saucedo A. 2016. Ruptura de latencia física en semillas de *Caesalpinia platyloba* S. Watson. *Interciencia* 41: 691-695.
- Smith, M. T., B. S. P. Wang, y H. P. Msanga. 2010. Dormancia y germinación. In: *Vozzo, J. A. (ed). Manual de Semillas de Árboles Tropicales*. United States Department of Agriculture. Washington, D. C. pp: 157-182.
- Timyan, J. 1996. Bwa yo: Important Tree of Haiti. South-East Consortium for Internacional Development. Washington, USA. 418 p.
- Walters, C., M. M. Hill, and L. J. Wheeler. 2005. Dying while dry: Kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms. *Integ. Comp. Biol.* 45: 751-758.
- Willan, R. L. 1991. A Guide to Forest Seed Handling. FAO. Rome. 502 p.

