Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riiit.com.mx

# Escarificación y germinación de semillas de *Lupinus spp. in vitro* y en sustrato

## *Scarification and germination of seeds Lupinus spp. in vitro and in substrate*

**Cárdenas-Murguía, A.[1], Pérez-Álvarez, S.[2], Salas-Salazar, N.A.[1], Rodríguez-Roque, M.J.[1], Soto-Caballero, M.C.[1], Flores-Córdova, M.A.[1]***

[1] Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Av. Pascual Orozco s/n, Campus 1, Santo Niño, Chihuahua, Chih.
[2] Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, Universidad Autónoma de Chihuahua, Km. 2.5 carretera a Rosales, Poniente, C. P. 33000 Delicias, Chih.
al0789x@gmail.com; spalvarez@uach.mx; nsalas@uach.mx; mjrodriguez@uach.mx; masotoc@uach.mx; mariflor_556@hotmail.com*

**Innovación tecnológica:** proceso de escarificación en semillas de *Lupinus in vitro* y sustrato.

**Área de aplicación industrial:** agrícola, vivero, industrial, cultivo *in vitro.*

Recibido: 03 enero 2022
Aceptado: 30 mayo 2022

## Abstract

The species of the genus *Lupinus* are legumes of great importance, due to their high protein content and their ability to fix nitrogen. Unfortunately, the seeds of *Lupinus spp.* are characterized by a hard pod, which is why they require treatments to induce germination. The objective of the study was to evaluate different methods of scarification and germination of *Lupinus* seeds *in vitro* and in substrate. The seeds were collected in the Izta-Popo National Park, in the state of Mexico, which were subjected to two chemical and mechanical scarification treatments and a control (without chemical or mechanical scarification): T1: Control; T2: 98% sulfuric acid for 15 min and removal of the seed tip; T3: 98% sulfuric acid for 10 minutes and removal of the seed tip, and two different forms of culture *in vitro* and in substrate. The results indicated that T3 with 98% sulfuric acid for 10 minutes and removal of the seed tip, germinated 94% in *in vitro* culture, and this same T3 obtained 64% germination in substrate culture. Finally, it was concluded that the combination of chemical and mechanical scarification favors the germination of the *Lupinus spp.*

**Keywords:** Sulfuric acid, peat moss, mechanics, seeds.

**Resumen**

La especie del género *Lupinus* son leguminosas de gran importancia, por su alto contenido de proteína y su capacidad de fijar nitrógeno. Desafortunadamente las semillas de *Lupinus* se caracterizan por presentar una testa dura, por lo que requieren de tratamientos para inducir la germinación. El objetivo del estudio fue evaluar diferentes métodos de escarificación y germinación de semillas de *Lupinus in vitro* y en sustrato. Las semillas se recolectaron en el Parque Nacional Izta-Popo, en el estado de México, las cuales se sometieron a dos tratamientos de escarificación química y mecánica y un testigo (sin escarificación química ni mecánica): T1: Testigo, T2: Ácido sulfúrico al 98% durante 15 min y remoción de la punta de la semilla, T3: Ácido sulfúrico al 98% durante 10 minutos y remoción de la punta de semilla, y dos diferentes formas de cultivo *in vitro* y en sustrato. Los resultados indicaron que el T3 con ácido sulfúrico al 98% por 10 minutos y remoción de la punta de la semilla, germinó un 94% en cultivo *in vitro*, y este mismo T3 obtuvo un 64% de germinación en cultivo en sustrato. Finalmente, se concluyó que la combinación de escarificación química y mecánica favoreció la germinación de la especie de *Lupinus spp.*

**Palabras clave**: Ácido sulfúrico, peat moss, mecánica, semillas.

## Introducción

En México, las especies silvestres de *Lupinus* (Fabaceae) se distribuyen desde Baja California hasta Tamaulipas y al sur de Chiapas, con mayor concentración en la Sierra Madre Occidental y el eje neo volcánico transversal (García-Pascual *et al*., 2020). El género *Lupinus* comprende entre 200 y 230 especies. Cerca del 60% son consideradas endémicas y crecen en ambientes poco favorables, como suelos ácidos, donde otras fabáceas no pueden adaptarse. Son capaces de fijar altas concentraciones de nitrógeno atmosférico $N_2$ (Lagunes-Espinoza *et al*., 2012; Luna-Zamora *et al*., 2019) que van de 0 a 463 kg N fijado $ha^{-1}$, de acuerdo con la especie y condiciones edafo-climáticas (Zamora *et al*., 2019). Esta leguminosa se caracteriza por su elevado contenido en proteína, aceite y alcaloides, así como, fuente de proteína en alimentos para animales (Águila *et al*., 2018). Sin embargo, las especies del género *Lupinus*, tiene semillas de testa dura e impermeable a la humedad y oxígeno, por lo que requieren de tratamientos de escarificación para inducir el ablandamiento y con ello la germinación (Australian Govermment, 2013).

La germinación *in vitro* se usa exitosamente para muchas especies, empleándose medios nutritivos en diversas concentraciones y otros a base de agar y agua solamente (Rodríguez *et al*., 2014). Dichas técnicas de cultivo *in vitro* posibilitan la producción de un enorme conjunto de plántulas, principalmente de genotipos de interés, en corto tiempo, mediante ambientes asépticos con recipientes cerrados, expuestos a bajos niveles de luz, sobre un medio gelificado que tiene nutrientes para ser conservados, y condiciones de alta humedad relativa (Delgado y Hoyos, 2016). De la misma manera, los fenómenos que afectan las condiciones ambientales en un recipiente de cultivo son muy parecidos a los que se presentan en el interior de un invernadero, debido a que un recipiente de cultivo es, hasta cierto punto, un invernadero miniatura con condiciones estériles (Cañal *et al*., 2001).

Los materiales usados como sustratos para la producción de plantas en contenedores o

macetas permiten el anclaje del sistema radicular como soporte para desarrollo y producción de la planta (Trejo-Téllez *et al*. 2018). Además, proporciona aire y agua, necesarios para el crecimiento de raíces y parte aérea (Cruz-Crespo *et al*., 2007), por lo que su elección es de suma importancia y son determinantes para asegurar su éxito ya que constituye uno de los conceptos de mayor costo en la producción (Fernández *et al*., 2006).

La importancia de las plantas del género *Lupinus* radica en el potencial que presentan en la industria forestal, agrícola y alimentaria, por su capacidad de fijar nitrógeno al suelo y mejorar la fertilidad de este, lo que permite la restauración ecológica. Además, de diversas actividades biológicas debido a sus metabolitos secundarios, como los alcaloides que presentan actividad hiperglucémica (Fornasini *et al.*, 2012). Desafortunadamente las semillas de esta especie tienen latencia física lo que impide la imbibición, y en consecuencia retarda el proceso de germinación (García *et al*., 2020), lo cual ha sido comprobado por diferentes autores, quienes han evaluado varios tratamientos para romper la latencia de la semilla, entre ellos se encuentran la escarificación mecánica, que consiste en remover la testa de la semilla por medio de navajas, pinzas o lijas para una mejor penetración de agua y oxígeno (Sánchez-Soto *et al*., 2017); la escarificación química con ácido por determinado tiempo; la escarificación térmica con la disminución del grosor de la testa calentando la semilla con agua hirviendo. Además, de otros tratamientos con substancias químicas como: giberelina, tiourea e hipoclorito de sodio (Corona *et al*., 2007; Gao *et al*., 2020). En algunas ocasiones las semillas que son sometidas a algún tipo de tratamientos muestran un aumento en el porcentaje de germinación en comparación con las semillas sin tratamientos pregerminativos (Corona *et al*., 2007).

Por lo tanto, el objetivo del experimento consistió en incrementar el porcentaje de germinación de las semillas de *Lupinus* spp., a través de la escarificación física y química en combinación con su siembra en medio de cultivo *in vitro* y en sustrato.

## Materiales y Métodos

### Material vegetal

El material vegetal usado en este trabajo fueron semillas de *Lupinus spp.* recolectadas en el Parque Nacional Izta-Popo del Estado de México, en el año 2019, ubicado a una altitud de 3581 msnm, latitud 19° 04’ 58.7’’ N y a una longitud 98° 39’ 38.7’’ O. Una vez recolectadas las semillas, se colocaron en bolsas de papel, identificadas y almacenadas a 4 ºC, hasta su análisis.

### Escarificación de las semillas

Las semillas fueron expuestas a distintos tratamientos: T1= Testigo (Sin escarificación química ni mecánica), T2: $H_2SO_4$ al 98% durante 15 min y remoción de la punta de la semilla, y T3= $H_2SO_4$ al con 98% durante 10 min y remoción de la punta de la semilla. Después de los tratamientos de escarificación se utilizaron 50 semillas de cada tratamiento y una vez realizada la escarificación, se lavaron tres veces con agua destilada y se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 20 minutos para su desinfestación con dos gotas de Tween 80® (polisorbato). Posteriormente, se colocaron en cajas de Petri esterilizadas con papel filtro de 15 a 20 minutos para su secado; finalmente se procedió a la siembra cortando con bisturí las semillas en el extremo de la semilla, antes de colocarlas en el medio de cultivo con agar y agua (6.5 g $L^{-1}$). Para el cultivo en sustrato se utilizaron 50 semillas y se siguió el mismo procediendo antes mencionado hasta la desinfestación, una vez desinfestadas las semillas y enjuagadas con agua destilada esterilizada se sembraron en charolas de 54 cavidades y 174 ml de cavidad, solo con peat

moss como sustrato.

**Germinación *in vitro***

Las semillas escarificadas y desinfestadas se depositaron en frascos de vidrio de 250 mL en los que se agregaron 25 mL del medio de cultivo con agar y agua para la germinación. Las semillas se mantuvieron en un cuarto de incubación: luz blanca fría (intensidad de 50 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$) fotoperíodo de 16 h y 27 °C. Las semillas que se consideraron como germinadas, fueron aquellas cuya radícula alcanzó 1 cm de longitud, el cual germinó a la semana de sembradas.

**Germinación en sustrato**

Las semillas después de escarificadas y desinfestadas se sembraron en contenedores de plástico de 54 cavidades a una profundidad de 2 cm en peat moss previamente humedecido a temperatura ambiente y colocados en invernadero a temperatura de 30 $^{o}$C. Los contenedores se regaron diariamente en los siguientes días, hasta que las semillas germinaron a las 96 h; una vez que hubo emergido 1 cm de longitud de la plántula, se cuantificaron.

**Variables evaluadas y análisis estadístico**

Se determinó el porcentaje de germinación (G) después de establecidos los tratamientos, para lo cual se contó el número de plántulas germinadas; dividido por el total de semillas sembradas inicialmente; multiplicado por 100. Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar, con tres tratamientos y cuatro repeticiones y unidad experimental de 50 semillas. Para determinar si existían diferencias estadísticas de G, respecto a los tratamientos, se utilizó un análisis de varianza simple y cuando se presentaron diferencias entre tratamientos, se realizó una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($p<0.05$), para ello se utilizó el software Sistema de Análisis Estadístico (SAS) versión 9.4.

**Resultados y Discusión**

**Germinación *in vitro***

En el testigo (T1) no se observaron semillas germinadas, lo que confirmó la presencia de una testa dura y poco permeable al agua y al oxígeno, creando una barrera que impidió la germinación y su desarrollo (Pablo-Pérez *et al*., 2013). En el tratamiento (T2) se observó que el porcentaje de germinación fue muy bajo del 6%. Tal vez la exposición de la semilla al ácido sulfúrico por más tiempo sufrió daño del tegumento por causa del calor extremo que se produce al remojar con el ácido logrando penetrar y dañar el embrión (Díaz-Vázquez *et al*., 2019), ocasionando el menor porcentaje de germinación. Los resultados obtenidos para el T3 *in vitro* presentaron un 94% de germinación el cual se alcanzó a la semana de sembradas. Se observaron diferencias estadísticas entre las condiciones probadas (*in vitro*) para este tratamiento (Figura 1).

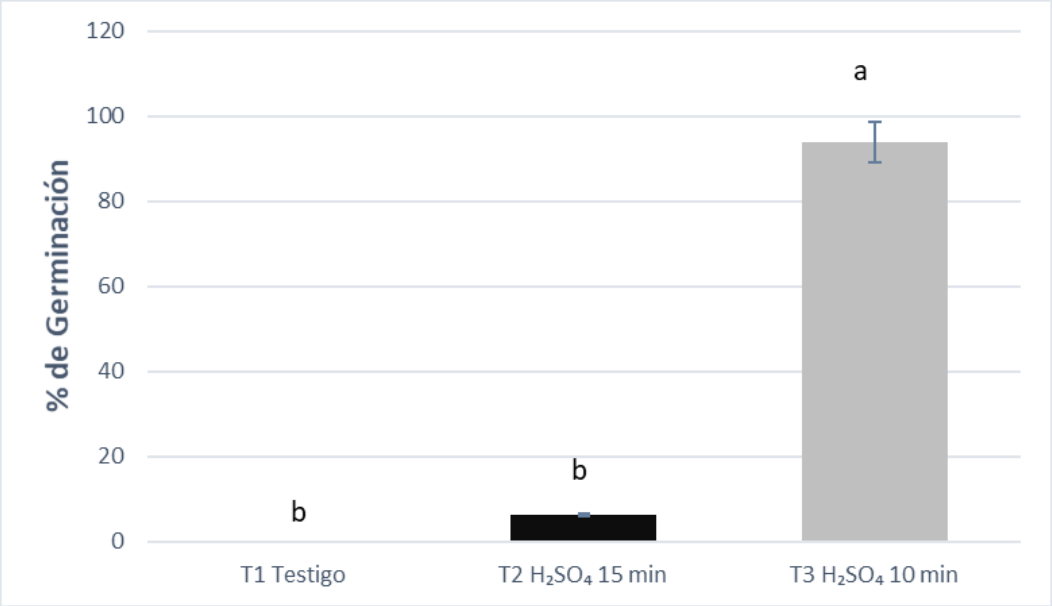



**Figura 1.** Porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *Lupinus* spp. T1= Testigo, T2= $H_2SO_4$ concentrado por 15 min y remoción de la punta de la semilla, y T3= $H_2SO_4$ concentrado 10 min y remoción de la punta de la semilla antes de la siembra.

Los resultados obtenidos de la combinación de la escarificación química y mecánica probablemente debilitaron el endospermo, ayudando al embrión a movilizar las reservas durante el proceso de germinación, debido a que el endospermo rico en carbohidratos como el manano funciona como molécula señal al promover una respuesta de crecimiento y desarrollo (Lara-Nuñez y Díaz Pontones 2011). De la misma manera, se ha confirmado que para el género *Lupinus* la escarificación química y mecánica favorece la germinación (Jones *et al*., 2016). Otros autores como García-Pascual *et al*. (2020) realizaron un proceso similar en semillas de *Lupinus bilineatus* Benth, para romper latencia de un largo periodo de 15 años de almacenamiento y obtuvieron un 48.9% de germinación. Por otro lado, Karaguzel *et al*. (2004) probaron en semillas de *L. varius*, escarificación en ácido sulfúrico y agua caliente por 24 h y obtuvieron resultados favorables en su germinación desde un 66 a 97%. Sin embargo, los autores mencionan que se presentaron daños en las plántulas. Además, la escarificación con ácido sulfúrico es importante toda vez que permite la permeabilidad al desgastar la testa de la semilla e inducir su germinación (Bautista-Rodríguez *et al*., 2017). Los métodos de escarificación de semilla tienen un efecto positivo en la germinación, sin embargo, varía según el método y la semilla del ecotipo empleado (Flores *et al*., 2018). Por tanto, los métodos de escarificación son específicos para cada especie (Matoor *et al*., 2019). El proceso de escarificación química se basa en que estas sustancias fragmentan o debilitan la testa, permitiendo el acceso de oxígeno, gases y agua hacia el embrión provocando la rotura de la cubierta seminal impermeable (Sánchez-Soto *et al*., 2017). De la misma manera para lograr una germinación y un crecimiento adecuado de las plantas en el medio de cultivo *in vitro*, los medios de cultivo utilizados deben ser adecuados para el crecimiento y desarrollo de los tejidos y órganos vegetales (Pereira *et al*., 2018) (Figura 2).

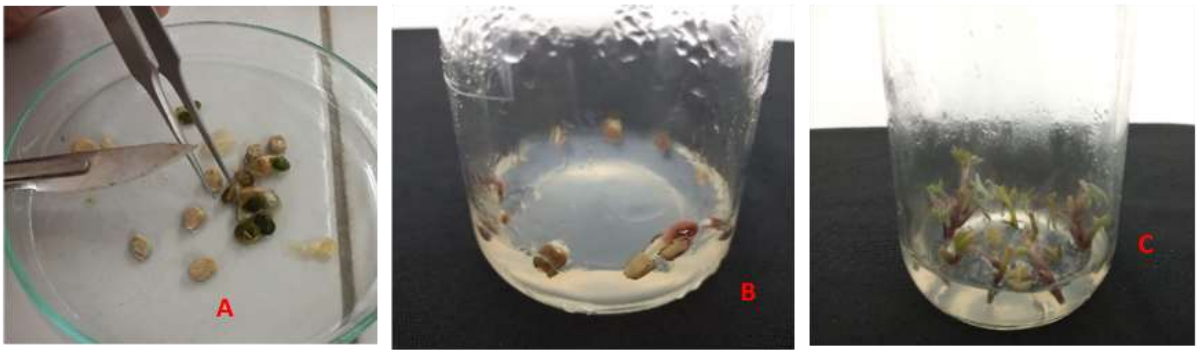



**Figura 2.** Germinación in vitro de *Lupinus* spp. A) Semillas escarificadas química y mecánicamente antes de la siembra y en el que se retiró la punta de la semilla antes de la siembra B) Semillas expuestas al T3 y luego sembradas en medio de cultivo C) Semillas sometidas al tratamiento T3 germinadas in vitro.

## Germinación en sustrato

La germinación de las semillas escarificadas (T1) fue nula, así como ocurrió en la germinación *in vitro*. En el T2 se observó que las semillas por el tiempo de exposición al ácido sulfúrico a los 15 minutos y al 98% presentaron un porcentaje de germinación casi nulo con 1% (Figura 3). En un trabajo realizado por Flores-Córdova *et al*. (2016) mencionan que las semillas tratadas con $H_2SO_4$ pueden eliminar el tegumento de la semilla causando daño al embrión, debido a la penetración del ácido por el tiempo prolongado, por lo que el tratamiento pudo ser agresivo. Los resultados obtenidos en sustrato con el T3 mediante escarificación con ácido sulfúrico al 98% y 10 minutos se obtuvo un porcentaje de germinación del 64%, de las semillas de *Lupinus* en sustrato peat moss, las cuales empezaron a germinar a partir del cuarto día (96 h).

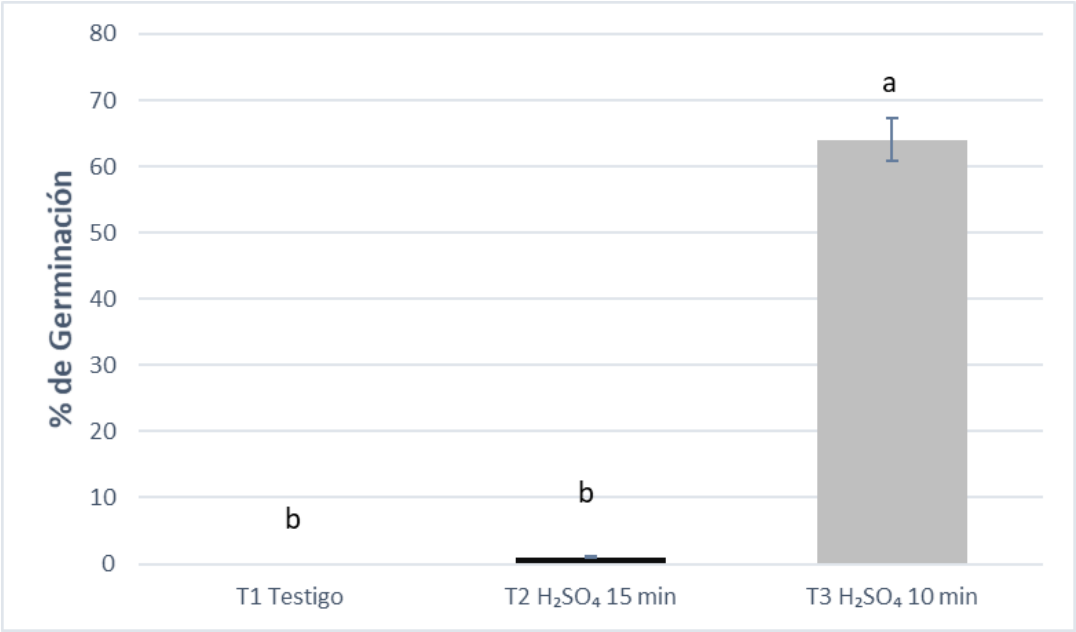



**Figura 3.** Porcentaje de germinación de semillas de *Lupinus spp.* en sustrato. T1= Testigo, T2= $H_2SO_4$ concentrado por 15 min y remoción de la punta de la semilla, y T3= $H_2SO_4$ concentrado 10 min y remoción de la punta de la semilla antes de la siembra.

Los resultados sugieren que la combinación de escarificación química y mecánica favoreció el porcentaje de germinación, obteniéndose plántulas sanas en condiciones de invernadero a partir de semillas escarificadas (Figura 4). Estudios realizados sobre especies de *Lupinus* han demostrado que se necesita escarificación mecánica o química para obtener una germinación rápida y uniforme Tiryaki y Topu (2014). Así mismo, el proceso de escarificación con ácido sulfúrico a los 10, 30 y 60 min, en semillas de *Lupinus elegans* en 4 diferentes sustratos (arena y suelo, suelo orgánico, composta comercial y arena) a una profundidad de 0.5 cm estimulo la germinación variando de 48 al 78% en condiciones de invernadero (Medina-Sánchez y Linding-Cisneros 2005). Por lo que, la escarificación es eficaz para promover la germinación, pero varían de acuerdo con el sustrato seleccionado. En otra investigación, escarificaron semillas de *L. campestri* con $H_2SO_4$ y las sembraron a una profundidad de 3 cm y obtuvieron un porcentaje de germinación del 50%. Además, estos autores indicaron que las semillas grandes de *Lupinus* se pueden sembrar en un rango de 6-9 cm de profundidad (Gutiérrez *et al*., 2010). De la misma manera, escarificaciones con $H_2SO_4$ por 15 min conjuntamente con la oscuridad, han dado como resultado una germinación del 100% e indicando que la oscuridad más la escarificación son factores que influyen en la germinación (Acosta-Percástegui y Rodríguez-Trejo 2005). La profundidad de la siembra de las semillas de *Lupinus* es importante, toda vez que presenta germinación epigea, debido a que los cotiledones emergen del suelo, en este proceso se activa la clorofila que se encuentra en los cloroplastos para realizar la fotosíntesis (Wulf *et al*., 2020). Todas estas variaciones se deben a las diferentes condiciones y diferentes tipos de especies. Sin embargo, cabe mencionar que aún se sabe poco sobre los requisitos para la germinación de la especie de *Lupinus spp*.




**Figura 4.** Germinación de las semillas de *Lupinus* con los diferentes tratamientos donde: A) inmersión en H2SO4 concentrado durante 10 min y cortar la semilla antes de la siembra). B-C) T3 Semillas de *Lupinus* en sustrato peat moss germinadas.

La germinación y la emergencia de las plántulas de *Lupinus spp*. son la etapa de vida más vulnerable a la mortalidad de las plantas (Gutiérrez *et al*., 2010). Si se comparan la germinación en los medios de cultivo *in vitro* y en sustrato, observamos que la escarificación presentó las condiciones óptimas y respondió a las necesidades de germinación de las semillas de *Lupinus* en ambas condiciones. Estudios posteriores pueden evaluar la supervivencia de las plántulas sembradas en campo y obtener información de importancia para su propagación. Este conocimiento beneficiaría a productores, tomando en cuenta su facilidad de fijar nitrógeno al suelo, así como ser utilizada en la industria agrícola, farmacéutica y alimentaria por lo que esta

especie puede ser de suma importancia económica, social y de salud.

## Conclusiones

El tratamiento de escarificación con $H_2SO_4$ (10 min) y remoción de la punta de la semilla, presentó los mejores resultados de germinación, obteniendo un porcentaje de germinación del 94% en cultivo *in* vitro, y un 64% de germinación en peat moss utilizado como sustrato. El ácido sulfúrico a los 10 minutos favorece el rompimiento de latencia de las semillas, pero a los 15 minutos las semillas se vieron afectadas y no benefició la germinación. El proceso de escarificación tanto química como física favorecen la germinación de semillas de *Lupinus spp.* y podría ser una alternativa para su propagación.

## Referencias bibliográficas


1. Abril-Santos, R., Ruiz-Vásquez, T., Alonso-Lazo, J. y Cabrera-Murillo, G. 2017. Germinación, diámetro de semilla y tratamientos pre-germinativos en especies con diferentes finalidades de uso. *Agronomía Mesoamericana*, 28: 703-717. doi:10.15517/ma.v28i3.26205

2. Acosta-Percástegui, J. y Rodríguez-Trejo, D. A. 2005. Factors affecting germination and pregerminative treatments of *Lupinus montanus* seeds. *Interciencia*, 30: 576-579. https://www.redalyc.org/pdf/339/33910811.pdf

3. Águila, S. I., Vázquez, C. O., López, U. J., López, L. A., Martínez, R. E., García, G. E. y Zamora C. E. M. 2018. Variación morfológica y reproductiva de nueve poblaciones naturales de *Lupinus campestris* Cham. & Schltdl. de la región centro oriente de Puebla, M. *Revista Científica Biológico Agropecuaria*, 6: 89-95. https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v6i2.Especial.261

4. Australian Govermment. 2013. The biology of *Lupinus* L. (*lupin* or *lupine*). Australia: Department of Healt and Ageing- Australia Govermment 1: 1-64. https://www1.health.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/5DCF28AD2F3779C4CA257D4E001819B9/$File/The%20Biology%20of%20Lupins.pdf

5. Bautista-Rodríguez, E. I., Lagunes-Espinoza, L.C., Lara V. F. M. Castelán-Estrada, M. y Conde Martínez, V. 2017. Comparison of pre-germination treatments in *Lupinus* spp. And their effects on germination and related solutes. *Bot. sci*., 2017, 95: 577-590. https://doi.org/10.17129/botsci.893.

6. Cañal, M. J., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez-Tames, R. y Majada, J. P. 2001. Fisiología del cultivo *in vitro*. *Biotecnología vegetal*, 1: 3-9. https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/59/htmL

7. Corona, M. A., Romero, M. G. y Cisneros, R. A. L. 2007. Efecto de la escarificación y la calidad de la luz en la germinación de *Lupinus eleg*ans. Biológicas *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, 9: 47-54. https://www.biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=20

8. Cruz-Crespo, E., Can-Chulin, A., Sandoval-Villa, M., Bugarín-Montoya, R., Robles-Bermúdez, A. y Juárez-López, P. 2007. Sustratos en la horticultura. *Revista Bio Ciencias*, 2: 17-26. http://revistabiociencias.uan.mx/inde

x.php/BIOCIENCIAS/article/view/31/168

9. Delgado, G. L. M. y Hoyos, S. R. A. 2016. Multiplicación clonal y sustrato e *in vitro* de la especie forestal nativa *Aniba perutilis Hemsl*. *Acta Agronómica*, 65:190-196. http://dx.doi.org/10.15446/acag.v65n2.42808

10. Fernández, B., Urdanet, N. y Silva, W. 2006. Germinación de semillas de tomate Cv. Río grande sembradas en bandejas plásticas, utilizando distintos sustratos. *Revista Facultad de Agronomía*, 23: 188-196. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182006000200006

11. Flores, B. A., Alcon, M., Aroni, G. y Villca, M. 2018. Métodos de recolección y tratamiento de semilla de salqa o q'ila-q'ila (*Lupinus spp*.). Revista de Investigación e Innovación *Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 5: 81-89. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2409-16182018000200010&lng=es&nrm=iso

12. Flores-Córdova, M. A., Sánchez-Chávez, E., Balandrán-Valladares, M. y Márquez-Quiroz, C. 2016. Efectividad de tratamientos pre-germinativos en la ruptura de la dormancia en las semillas forrajeras y de malezas. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 3: 427-432. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282016000300427

13. Díaz-Vázquez, D. P., Félix-Herrán, J. A., Sañudo-Ayala, E., Ruelas-Ayala, R.D. 2019. Respuesta de las semillas de palo colorado (*Caesalpinia platyloba* S. Watson) a diferentes tratamientos pregerminativos. *Tecnociencia*, 13: 173-180. https://vocero.uach.mx/index.php/tecnociencia/article/view/480/437

14. García-Pascual, E., Rodríguez-Trejo, D. A., Guízar-Nolazco, E. y Arteaga-Martínez, B. 2020. Capacidad germinativa y su tasa de declinación en semilla de *Lupinus bilineatus Benth*, almacenados 15 años. *Agrociencia*, 54: 115-127. https://agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/view/1886

15. Gao, Y., Zhu, M., Ma, Q. y Li, S. 2020. Dormancy breakage in *Cercis chinensis* seeds. *Canadian Journal of Plant Science***,** 6: 666-673. https://doi.org/10.1139/cjps-2019-0229

16. Gómez-Merino, F. C., Vidal-Morales, B., Trejo-Téllez, L. I. y da Silva, C. M. 2010. Escarificación y germinación *in vitro* de semillas de heliconias. *Boletín de Pesquisa e Desenvolvimiento*, 6: 6-12. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792010000300008

17. Gutiérrez, N. P., De León, G. P., Etchevers, B. J. y Casas, F. A. 2010. Effect of scarification, self-inhibition, and sowing depth on seed germination of *Lupinus campestris*. *CHILEANJAR*, 70: 365-371. DOI: 10.4067/S0718-58392010000300003

18. Jones, C. D., Stevens, M. R., Jolley, V. D., Hopkins, B. G., Jensen, S. L., Turner, D., Steller, J. M. 2016. Evaluation of thermal, chemical, and mechanical seed scarification methods for 4 great basin lupine species. *Native Plants Journal*, 17: 5-18.

https://www.fs.usda.gov/treesearch/pubs/53267

10. Karaguzel, O., Cakmakc, S., Aydnoglu, B. y Ortacesme, V. 2004. Influence of seed coat treatments on germination and early seedling growth of *Lupinus varius* L. Pakistan *Journal of Botany*, 36: 65-74. http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.554.59&rep=rep1&type=pdf

20. Lagunes-Espinoza, L. C., López-Upton, J., García-López, E., Jasso-Mata, J., Delgado-Alvarado, A. y García de Los Santos, G. 2012. Diversidad morfológica y concentración de proteína de *Lupinus spp.*, en la región centro-oriental del estado de Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana*, 99: 73-90. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-71512012000200005

21. Lara-Nuñez, A., Díaz-Pontones, D.M., "011. Movilización de mananos de reserva en semillas durante la germinación y post-germinación. *REB*, 30: 109-115. https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2011/reb113c.pdf

22. Luna-Zamora, G., Pro-Martínez, A., Mendoza-Pedroza, S., González-Cerón, F., Sosa-Montes, E., Rodríguez-Ortega, L., Rodríguez-Ortega A. y Luna-Botello, A. 2019. Lupino (*Lupinus angustifolius* L.): Una alternativa de proteína para consumo animal y humano en México. *Agroproductividad*, 12: 53-57 doi.org/10.32854/agrop.v0i0.1451

23. Matoor, M. G., Ahmad, I., Taimoor, H. F., Wu, P., Yousaf, M. S., khan, M. W., Yousaf, T. B. y Ma, X. 2019. Effects of pre-sowing treatments on seed germination and Morphological growth of *Acacia nilotica* and *Faidherbia albida. Scientia Fororestalis*, 47: 374-382 doi.org/10.18671/scifor.v47n122.20

24. Medina-Sánchez, E. I. y Lindig-Cisneros, R. 2005. Effect of scarification and growing media on seed germination of *Lupinus elegans* H.B.K. *Seed Science and Technology*, 33: 237-241. ttps://doi.org/10.15258/sst.2005.33.1.24

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

26. Pereira, N. S., Rodríguez, R. F. B., Machado, C. E. y Damiani, C. R. 2018. Application of C*hlorella sorokiniana* (*Chlorophyceae*) as supplement and/or an alternative medium for the *in vitro* cultivation of *Schomburgkia crispa* (*Orchidaceae*). *Journal of Applied Phycology*, 30: 2347-2358. DOI: 10.1007/s10811-1441-2

27. Rodríguez, M., Chacón, M. y Carrillo, R. 2014. Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la germinación *in vitro* de *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35: 119-122. http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002014000100012

28. Sánchez-Soto, B. H., Pacheco-Aispuro, E., Lugo-García, G. A., Reyes-Olivas, Á. y García-Moya, E. 2017. Métodos de escarificación en semillas de *Guaiacum coulteri*, especie amenazada del bosque tropical caducifolio del norte de Sinaloa, México. Gayana. *Botánica*, 74: 262-

268. doi.org/10.4067/S0717-66432017000200262

29. Tiryaki, I. y Topu, M. 2014. A novel method to overcome coat-imposed seed dormancy in *Lupinus albus* L. and *Trifolium pretense* L. *Journal of Botany*, 1-6. https://doi.org/10.1155/2014/647469

30. Trejo-Téllez, L. I., García-Albarado, C., Méndez-Urbano, D., Pérez-Sato, J. A. y Gómez-Merino, F. C. 2018. Plant growth and nitrogen concentration of *Tillandsia* species produced in organic, volcanic, and lignocellulosic substrates, *Journal of Plant Nutrition*, 41: 20, 2547-2559, DOI: 10.1080/01904167.2018.1482911

31. Wulf, K. E., Reid, J. B. y Foo, E. 2020. What drives interspecies graft union success? Exploring the role of phylogenetic relatedness and stem anatomy. *Physiologia Plantarum*, 0: 1-16. DOI: 10.1111/ppl.13118o

32. Zamora N. J. F., Zapata H. I. y Villalvazo H. A. 2019. Fijación biológica del nitrógeno en tres especies silvestres del género *Lupinus* (*Leguminosae, Papilionoideae)* en México. *Acta Botánica Mexicana*, 126: 1-11. https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1543.