

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Caracterización Físico-química y Calidad de Semilla de Diferentes Genotipos de Comba
(*Phaseolus lunatus*) de la Región de Tierra Caliente, Guerrero.

Por:

J ISABEL NAMBO GARCIA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México.

Septiembre, 2022.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Caracterización Físico-química y Calidad de Semilla de Diferentes Genotipos de Comba
(*Phaseolus lunatus*) de la Región de Tierra Caliente, Guerrero.

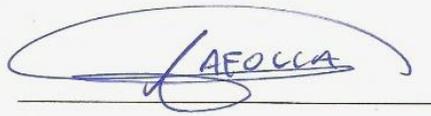
Por:

J ISABEL NAMBO GARCIA

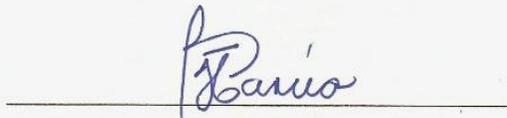
TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:
INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Aprobada por el Comité de Asesoría:



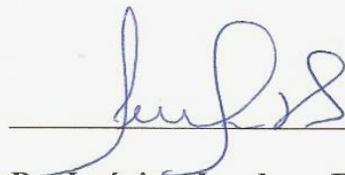
Dr. Julio César Tafolla Arellano
Asesor Principal



Dra. Hermila Trinidad García Osuna
Coasesor



Dra. María Alejandra Torres Tapia
Coasesor



Dr. Jerónimo Landeros Flores
Coordinador de la División de Agronomía



Buenavista, Saltillo Coahuila, México.

Septiembre 2022.

DERECHO DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.

Atentamente.

Alma Terra Mater

J Isabel Nambo Garcia
Autor principal

Dr. Julio César Tafolla Arellano
Asesor Principal

}

DEDICATORIA

A mis padres **MATEO NAMBO GANDARILLA** y **FRANCISCA GARCIA MOJICA** por darme la vida y la facilidad para poder concluir mis estudios, a todos sus consejos, valores de ser una persona de bien, a esa frase; **“ÉCHALE GANAS PARA QUE SEAS ALGUIEN EN LA VIDA” MI MEJOR HERENCIA, MUCHAS, MUCHAS GRACIAS.**

A mi hermana **KARINA NAMBO GARCIA** te agradezco por el apoyo que me brindaste, por compartir tus conocimientos y estar siempre ahí para lo que necesitara.

A cada uno de mis amistades y familiares, vecinos que creyeron en mí y siempre me apoyaron muchas gracias.

A MIS ABUELOS.

MARGARITA GANDARILLA, J. ISABEL NAMBO, ELVIRA MOJICA.

Por la bendición que siempre y en cada momento he tenido de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por otorgarme la vida y darme salud a mí y a mi familia, porque sin ellos nada de esto sería posible, por darme y fortalecer mi espíritu y estar siempre a mi lado en los momentos más difíciles y por ayudarme a terminar una meta más de satisfacción en mi vida gracias familia porque jamás me dejaron de apoyar, su apoyo fue incondicional, ustedes fueron mi inspiración para poder concluir con éxito esta etapa en mi vida.

AL UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO” por abrirme las puertas y brindarme los conocimientos adquiridos para la formación de esta ingeniería.

A mis buenos amigos, que en mi estancia por la Universidad conocí, donde me brindaron su amistad y apoyo incondicionalmente: **Osorio, Dámaso, Ricardo** y a mis compañeros de cuarto del **Módulo 4** y **Porfirio 1**.

Al **Dr. JULIO CÉSAR TAFOLLA ARELLANO** por brindarme la asesoría y el apoyo, que en cada momento estuvo ahí para apoyarme, además de brindarme las instalaciones para poder realizar este estudio, ¡muchas gracias!

A mi comité de asesoría: **Dra. María Alejandra Torres Tapia** y **Dra. Hermila Trinidad García** Osuna por el apoyo y facilidades para la culminación de este trabajo de investigación.

Al M.C. Bernardo Rincón López y los compañeros del Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular por su apoyo.

A cada uno de mis profesores que me aportaron de sus conocimientos, lo cual fue parte fundamental de mi educación como estudiante y gracias a ello he cumplido una meta importante en mi vida.

ÍNDICE GENERAL DEL CONTENIDO

DERECHO DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIOError! Bookmark not defined.

DEDICATORIA..... III

AGRADECIMIENTOS V

ÍNDICE DE CUADROS VIII

ÍNDICE DE FIGURAS IX

RESUMEN X

I. INTRODUCCIÓN 1

1.1 Hipótesis 4

1.2 Objetivo General 4

1.3 Objetivos específicos 4

1.3.1 Caracterizar diferentes genotipos de comba (*Phaseolus lunatus*) de la región de Tierra Caliente, Guerrero a través de estudios físico-químicos, tales como: proteína, fibra, grasa y extracto libre de nitrógeno..... 4

1.3.2 Identificar la calidad física de la semilla de diferentes genotipos de comba (*Phaseolus lunatus*) de la región de Tierra Caliente, Guerrero, mediante pruebas morfológicas y físicas, tales como: forma, tamaño, color, peso volumétrico y de mil semillas. 4

1.3.3 Analizar e identificar grupos funcionales dentro del grano de diferentes genotipos de comba (*Phaseolus lunatus*) de la región de Tierra Caliente, Guerrero, mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)..... 4

II. REVISIÓN DE LITERATURA 5

2.1 Generalidades de la Comba 5

2.1.1 Botánica..... 5

2.1.2 Descripción morfológica de la planta 6

2.1.3 Características de la semilla 7

2.1.4 Características de la raíz..... 7

2.1.5 Características de la flor 8

2.1.6 Características del fruto 8

2.1.7 Germinación 9

2.1.8 Hábitat y distribución..... 9

2.1.9 Usos de la comba 10

2.2 Análisis Físico – Químico 10

2.3 Caracterización y análisis de semillas 12

2.3.1	Importancia de la caracterización	13
2.3.2	Calidad de la semilla	14
2.3.3	Descripción varietal	14
2.3.4	Características físicas de la semilla	14
2.3.5	Color de la semilla	16
2.4	Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR)	16
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1	Material vegetal	18
3.2	Métodos para el análisis químico proximal	18
3.2.1	Determinación de Cenizas	18
3.2.2	Determinación de Proteína Cruda	19
3.2.3	Determinación de Extracto etéreo o grasa	20
3.2.4	Determinación de Fibra cruda	21
3.2.5	Determinación de Extracto libre de nitrógeno (ELN)	22
3.3	Extracción y purificación de la muestra	22
3.4	Calidad física de la semilla	22
3.4.1	Caracterización morfológica	22
3.4.2	Tamaño de semilla	23
3.4.3	Color de testa de la semilla	23
3.4.4	Color y tipo de hilio	24
3.4.5	Brillantez de la semilla	25
3.4.6	Peso de Mil Semillas	25
3.4.7	Peso volumétrico	26
3.5	Análisis Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	27
3.6	Análisis estadístico	27
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1	Análisis químico proximal	28
4.2	Calidad de semilla	31
4.3	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	34
V.	CONCLUSIONES	36
VI.	LITERATURA CITADA	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Aspectos relacionados con calidad de semillas.	15
Cuadro 2. Ubicación geográfica de las colectas de <i>P. Lunatus</i> en la región de Tierra Caliente, Gro.....	18
Cuadro 3. Análisis químico proximal de <i>Phaseolus Lunatus</i> . Error! Bookmark not defined.	
Cuadro 4. Caracterización de semilla.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comba asociada a maíz en los campos de Tlalchapa, Guerrero.....	3
Figura 2. <i>Phaseolus lunatus</i>	6
Figura 3. Características del tallo de la planta de <i>P. lunatus</i>	7
Figura 4. Floración de la comba	8
Figura 5. Distribución mundial de la comba	9
Figura 6. Distribución nacional de la comba.....	10
Figura 7. Determinación de color (A) y forma de semilla (B)	13
Figura 8. Regiones del espectro electromagnético	16
Figura 9. Determinación de cenizas.....	19
Figura 10. Proceso de digestión para determinar proteína cruda	19
Figura 11. Determinación de extracto etéreo	20
Figura 12. Determinación de fibra cruda	21
Figura 13. Medición de semilla	23
Figura 14. Determinación del color en la semilla.....	24
Figura 15. Dterminación del color y tipo de hilio	24
Figura 16. Prueba de brillantez de semilla	25
Figura 17. Prueba de peso de mil de semillas	25
Figura 18. Determinación de peso volumétrico	26
Figura 19. Forma de la semilla de <i>Phaseolus lunatus</i>	31
Figura 20. Estudio morfológico en el tamaño de la semilla de <i>Phaseolus lunatus</i> ;	32
Figura 21. Estudio morfológico con respecto al color de semilla de <i>Phaseolus lunatus</i> ;	32
Figura 22. Espectro infrarrojo de muestra con y sin purificar de polifenoles de comba.	35

RESUMEN

Phaseolus lunatus, comúnmente conocida en la región de Tierra Caliente, Guerrero, como “Comba”, representa un importante valor cultural, es fuente de alimento, así como una actividad económica para los campesinos en dicha región. Sin embargo, no se han realizado estudios morfológicos de caracterización de las semillas, ni su composición fisico-química, compuestos antioxidantes o grupos funcionales. En el presente trabajo se evaluaron los cinco genotipos de *Phaseolus lunatus*, en la región de Tierra Caliente, Guerrero; con el objetivo de determinar las características fisico-químicas y calidad de la semilla. Los resultados en el análisis químico proximal indicaron que el genotipo Comba Blanca Violenta (CBV) obtuvo el mayor valor de cenizas con 4.23 ± 0.25 g 100g^{-1} ; mientras Comba Blanca (CB) obtuvo el mayor contenido de proteína cruda con 27.5 ± 0.18 g 100g^{-1} . El genotipo Comba Floja Ojo Negro (CFON) presentó los mayores valores en el extracto etéreo-grasa, con 9.95 ± 0.94 g 100g^{-1} ; y en fibra cruda, con 3.18 ± 3.40 g 100g^{-1} ; así mismo, el genotipo Comba Pinta Violenta (CPV) resultó con el mayor valor de extracto libre de nitrógeno con 47.04 ± 3.56 g 100g^{-1} . En las características morfológicas, los cinco genotipos presentaron forma ovoide; teniendo CB una coloración blanca de 5Y 9/2, los genotipos CFON, CPV y CBV son blancos amarillentos de 2,5 y 8/4; mientras que CMV es blanco amarillento de 2,5 y 8.5/4. Además, los cinco genotipos evaluados presentaron brillantez en la testa y una coloración de hilo perfecto, salvo el genotipo CBV. En el estudio métrico, CFON presenta el mayor diámetro polar de 10.76 mm, en cambio CB, el mayor diámetro ecuatorial de 14.89 mm; mientras que CBV presenta el mayor espesor con 4.59 mm. En las características físicas de la semilla, el genotipo CB presentó el mayor peso de mil semillas con 50.68 g; y CFON obtuvo el mayor peso volumétrico de 74.32 g/Hl. Con base en el análisis FTIR, la “comba” presentó picos en el rango comprendido entre $3000-2840$ cm^{-1} asociados a alcanos de la cadena corta del grupo funcional C-H. En $1650-1426$ cm^{-1} se detectó presencia de almidón. El pico 1636 cm^{-1} responde a alcanos conjugados. El rango de los $1550-1500$ cm^{-1} está asociado a compuestos nitrogenados encontrados en los 1540 cm^{-1} . Entre los 861 , 762 y 713 cm^{-1} responde a anillos de la piranosa, presente en la unidad estructurales básicas de las leguminosas que presentan esqueleto de B-D-manopiranosas.

Palabras clave: Comba, análisis químico proximal, FTIR, grupos funcionales.

I. INTRODUCCIÓN

Phaseolus lunatus, conocida en la región de Tierra Caliente, Guerrero, como “comba” es una especie herbácea anual de la familia de las leguminosas. Esta planta habita en distintos ambientes tropicales, trópico húmedo, trópico seco, así como en el bosque tropical caducifolio (Rojas-Chávez, 2010).

La comba representa gran valor cultural en la región y a su vez genera ingresos económicos a las personas que la cultivan, debido a que su venta en las poblaciones cercanas representa el sustento de las familias que se encargan de realizar labores en campo (Matod-Cuzcano y Zuñiga-Dávila, 2002).

Esta leguminosa podría ser cultivada en otras regiones del país, pero como lo menciona Yates et al., (2004), existen al menos dos limitaciones prácticas para la introducción de leguminosas exóticas: la identificación de especies adecuadas y la falta de conocimiento relacionado con las bacterias que pueden formar nódulos radicales y que son nativas de los suelos objetivo.

Phaseolus lunatus L, comúnmente conocido por los agricultores como frijol lima, comba, haba pallar o frijol mantequilla es uno de los cinco taxa domesticados del género *Phaseolus* y se ha reportado que ocupa el segundo lugar en cuanto mayor distribución, superficie cultivada y consumo de la especie en el mundo (Lopez-Alcocer et al., 2016).

Diferentes estudios señalan que *P. lunatus* pudo originarse en la región neotropical de América, desde México y América Central, abarcando hasta la región andina de Perú, Chile y la zona central de América del Sur. Se ha reportado que Guatemala podría ser el lugar de origen, por haberse hallado al progenitor silvestre de esta especie en ese país. Sin embargo, otros estudios indican, incluso con evidencias moleculares, que su procedencia corresponde en la región andina y que su distribución ancestral por toda América se dio mediante su domesticación (FAO, 2018). En este sentido se han definido dos acervos genéticos de *Phaseolus lunatus*: Andino (A) y Mesoamericano (M). En el acervo genético Mesoamericano se han propuesto dos grupos genéticos principales: Mesoamérica I (MI) y Mesoamérica II (MII) con una distribución geográfica distinta: MI, con presencia principal en el occidente de México, y MII desde el sur

de México y Centro América hasta el norte de Argentina. En un estudio utilizando marcadores moleculares con microsatélites, analizaron 67 poblaciones de *P. lunatus* silvestre originarias de México donde proponen la existencia de dos subgrupos dentro de MI (MIa y MIb) con sobreposición en su distribución geográfica. (Martínez-Castillo et al., 2014).

De acuerdo a Lopez-Alcocer et al., (2016) para a la domesticación de la especie, hasta ahora se han propuesto tres centros de domesticación: para el acervo genético Andino su centro de domesticación se ubica en los valles entre Perú y Ecuador. Para el caso del acervo Mesoamericano, se proponen dos áreas: la región occidente de México, entre los estados de Jalisco, Michoacán y Guerrero para el grupo genético MI, y para MII el área situada entre Guatemala y Costa Rica.

El grupo *Phaseolus* incluye *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. polyanthus* y *P. acutifolius*. La quinta especie cultivada, *P. lunatus*, forma parte de un acervo genético muy bien definido que incluye la diversificación sudamericana y de las islas oceánicas de *Phaseolus*, es decir, *P. augusti* Harms, *P. bolivianus* Piper, *P. lignosus* Britton, *P. mollis* Hook, *P. pachyrrhizoides* Harms, *P. rosei* Piper y *P. viridis* Piper (Delgado Salinas et al., 1999).

Se cultiva en la región de tierra caliente que corresponde a los estados de México, Guerrero y Michoacán, donde se le conoce como frijol “comba”, la cual es muy ampliamente aceptada y consumida por la población, se siembra en condiciones de secano o temporal, en pequeñas parcelas ubicadas en los bajiales de ríos o laderas, asociado con maíz o en unicultivo con varas como tutor (Figura 1) (López-Alcocer et al 2016).



Figura 1. Comba asociada a maíz en los campos de Tlalchapa, Guerrero.

A pesar que la comba se ha utilizado como alimento y es ampliamente cultivada y consumida; no existen estudios sobre la caracterización morfológica y la calidad física de la semilla de los diferentes ejemplares que se producen en esta región del país, ni su composición físico-química, compuestos antioxidantes o grupos funcionales. Aspectos que serían relevantes e interesantes de conocer, ya sea para fines de conservación de material genético, donde es necesaria la identidad propia de los genotipos, así como para promover como un cultivo alternativo entre los básicos, o como otra opción de negociación o autoconsumo de los agricultores en estas regiones, o hasta para extender el consumo a otras entidades del país.

Cualquiera que sea el fin, el establecer tanto un programa de mejoramiento o un sistema de producción, es necesario saber, en primer lugar el conocimiento y distinción de los materiales genéticos sobre todo en la estructura de reproducción como semilla, donde se consideran sus atributos genéticos, físicos, fisiológicos y sanitarios, que en conjunto determinan el nivel de calidad de la semilla (Milošević *et al.*, 2010), para fines de comercialización o como factores que determinan el potencial de un genotipo en un programa de fitomejoramiento. Y en segundo, el identificar los componentes físico-químicos del grano, que permiten determinar su valor

nutricional para consumo, inclusive fundamental en el valor agronómico como un carácter distinción en comparación con otros genotipos y/o variedades.

Por lo anterior, para el presente trabajo se establecieron la hipótesis y objetivos siguientes:

1.1 Hipótesis

La caracterización físico-químico de grano y la calidad física de semilla de los genotipos de comba (*Phaseolus lunatus*), permitirá la identificación de los genotipos sobresalientes y tendrán la posibilidad ser considerados como material genético inicial para un programa de mejoramiento como cultivo alternativo y/o con potencial para un sistema de producción de conservación o comercial en la región de Tierra Caliente, Guerrero

1.2 Objetivo General

Caracterizar diferentes genotipos de comba (*Phaseolus lunatus*) originarios de la región de Tierra Caliente, Guerrero, a través de estudios físico-químicos y de calidad de semilla, para propósitos futuros de producción, mejoramiento y/o de conservación.

1.3 Objetivos específicos

1.3.1 Caracterizar diferentes genotipos de comba (*Phaseolus lunatus*) de la región de Tierra Caliente, Guerrero a través de estudios físico-químicos, tales como: proteína, fibra, grasa y extracto libre de nitrógeno.

1.3.2 Identificar la calidad física de la semilla de diferentes genotipos de comba (*Phaseolus lunatus*) de la región de Tierra Caliente, Guerrero, mediante pruebas morfológicas y físicas, tales como: forma, tamaño, color, peso volumétrico y de mil semillas.

1.3.3 Analizar e identificar grupos funcionales dentro del grano de diferentes genotipos de comba (*Phaseolus lunatus*) de la región de Tierra Caliente, Guerrero, mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de la Comba.

P. lunatus es una enredadera herbácea de rápido crecimiento, que alcanza hasta 6 m de longitud, que puede convertirse en maleza en la naturaleza. Puede colonizar rápidamente áreas degradadas y vegetación secundaria formando densos matorrales que desplazan a la vegetación nativa. Además, *P. lunatus* tiene un enraizamiento profundo, tolerancia a la sequía y una amplia adaptación ambiental, que son características que lo ayudan a colonizar nuevos hábitats, incluidas áreas degradadas e infértiles (Baudoin, 2006). Sin embargo, ha sido catalogada como invasora en diferentes países como Cuba, Puerto Rico, Filipinas, Nueva Caledonia y Nueva Zelanda (Oviedo Prieto *et al.*, 2012; PIER, 2014).

Phaseolus lunatus, es miembro muy importante de la familia (*Leguminosae* o *Fabaceae*), la cual siendo una planta herbácea con un hábito trepador podemos encontrar variedades bianuales o perennes (FAO, 2018).

Phaseolus lunatus es una fuente potencial de almidón, donde en la actualidad la industria moderna tiene el interés de descubrir nuevas fuentes potenciales de este polisacárido tan importante. La comba tiene un alto potencial agronómico en condiciones tropicales, con rendimientos de hasta 2580 kg/ha (David, *et al.*, 2001).

2.1.1 Botánica

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Fabales*

Familia: *Fabaceae*

Género: *Phaseolus*

Especie: *lunatus*

2.1.2 Descripción morfológica de la planta

Es una hierba herbácea de hábito principalmente trepador (**Figura 1**) y pueden ser bianuales o perennes (rebrotan de las raíces), e incluso en algunas regiones son tratadas como anuales (FAO, 2018).

La altura depende de la variedad: en las erectas o arbustivas alcanza los 50 cm, mientras que en las rastreras llega a 4.5 m de longitud (Delgado-Salinas *et al.*, 1999). Posee tallos herbáceos (**Figura 2**) en algunos casos leñosos, estriados, levemente pubescentes o glabros. Además, presenta hojas pequeñas, alternas, trifoliadas, con los folíolos ovalados, lanceolados, rómbicos u ovoides, que van en un rango de 3 cm a 19 cm de largo y 1 cm a 11 cm de ancho, con ápice agudo y base redondeada (FAO, 2018).

P. lunatus es una especie bisexual en la que la autogamia se ve favorecida por la madurez sincronizada de los granos de polen y el estigma en sus flores, así como la proximidad dentro de la yema (Martínez-Castillo *et al.*, 2007). Sin embargo, se han reportado tasas de cruzamiento entre 0.02% y 48%, dependiendo del genotipo, condiciones de crecimiento, distancia entre plantas, dirección del viento y poblaciones locales de insectos polinizadores (Baudoin *et al.*, 1998).



Figura 2. *Phaseolus lunatus*.

(Suvarna Parbhoo M. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/observations/43953892>).

2.1.3 Características de la semilla

La comba posee frutos oblongos, con forma de hoz, péndulos (sujetado por la parte apical) de 3.5 a 6.5 y hasta 8.3 cm de largo por 1 a 1.4 cm de ancho, comprimidos, dehiscentes, vainas delgadas, glabras o escasamente pubescentes; semillas de 3 a 6, oblongas, cuadradas, reniformes de 6 a 10 mm de largo por 5 a 9 mm de ancho, comprimidas, cafés a negras, moteadas con negro, hilo, oblongo de 1.5 a 2.5 mm de largo, germinación epigea (Rojas-Chávez, 2010).



Figura 3. Características del tallo de la planta de *P. lunatus*

Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolus-lunatus/fichas/pagina1.htm>

2.1.4 Características de la raíz

La comba presenta raíces primarias pivotantes no engrosadas, fibrosas, de hasta 1.5 m de longitud (Delgado-Salinas *et al.*, 1999). *P. lunatus* puede fijar nitrógeno mediante simbiosis con la bacteria *Bradyrhizobium*. En los trópicos, esta especie se cultiva a menudo en huertos familiares o se intercalan con cereales (maíz, sorgo), raíces y tubérculos (ñame, mandioca) u otros cultivos como el algodón y la caña de azúcar (Hernández y León, 1994; Baudoin, 2006).

2.1.5 Características de la flor

Se ha reportado que las inflorescencias tienen de 15 cm hasta 40 cm de largo, el raquis con varios nudos con más de 2 flores y pedicelos de 5 mm a 10 mm de largo. Las flores son bisexuales pequeñas. Tienen de 1 cm a 1,5 cm de largo, con variedad de colores que van del blanco al rosa y hasta morado (**Figura 4**).

Tienen un cáliz de 2,5 mm a 3,5 mm de largo, glabro o con pocos tricomas; dientes laterales e interior triangulares; el estandarte oblongo de 6 mm a 7 mm de largo; las alas con forma ovoide de 10 mm a 15 mm de largo, estambre vexilar y ovario glabro; y quilla de color amarillo (Delgado-Salinas *et al.*, 1999).



Figura 4. Floración de la comba

Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolus-lunatus/fichas/pagina1.htm>

2.1.6 Características del fruto

Frutos oblongos (más largo que ancho), falcados (con forma de hoz), péndulos (sujetado por la parte apical) y llegan a tener de 3.5 a 6.5 y hasta 8.3 cm de largo por 1 a 1.4 cm de ancho, comprimidos, dehiscentes (que abren al madurar), valvas (segmento de un fruto después de abrir) delgadas a subcoriáceas (casi como cuero), glabras o escasamente pubescentes (Rojas-Chávez, 2010).

2.1.7 Germinación

La germinación y emergencia ocurren de 4 a 10 días después de la siembra. El crecimiento vegetativo se acelera después de un mes. Las flores aparecen entre 35 y 70 días y las vainas maduras entre 80 y 120 días después de la siembra en días cortos (Baudoin, 1989; Baudoin, 2006).

2.1.8 Hábitat y distribución

P. lunatus se ha cultivado ampliamente en regiones tropicales y subtropicales del mundo, lo que facilita su establecimiento y naturalización. Los españoles llevaron semillas a través del Pacífico a Filipinas y desde allí se extendieron a otras partes de Asia, principalmente Java, Myanmar y Mauricio.

La trata de esclavos introdujo *P. lunatus* de Brasil en África, particularmente en las partes occidental y central. Algunos tipos de semillas grandes de la costa peruana se distribuyeron al suroeste de Madagascar y al sur de California (Baudoin, 2006).

P. lunatus es nativo de América tropical y subtropical (Figura 4), desde el norte de México hasta el sur de Argentina y Paraguay (USDA-ARS, 2014). Se ha cultivado ampliamente en todo el mundo y ahora se puede encontrar cultivado y naturalizado en las Indias Occidentales, Asia, África, Europa y en varias islas del Océano Pacífico (Baudoin, 2006 ; DAISIE, 2014 ; ILDIS, 2014 ; PIER, 2014).

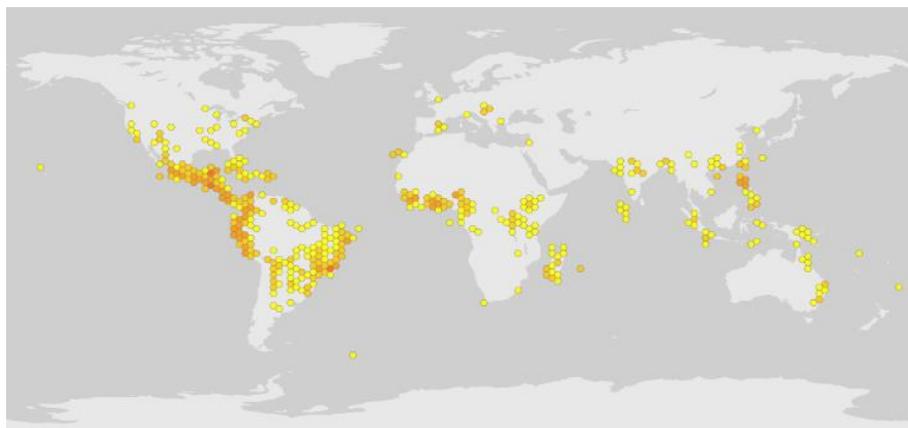


Figura 5. Distribución mundial de la comba

(GBIF, 2021).

En México se ha reportado la presencia de una gran variedad de genotipos de *P. lunatus* en los estados de Baja California Sur, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Puebla, Veracruz, Campeche, Yucatán, entre otros (**Figura 6**).



Figura 6. Distribución nacional de la comba
(GBIF, 2021)

2.1.9 Usos de la comba

P. lunatus se cultiva principalmente por sus semillas, que se utilizan en sopas, ensaladas, guisos y como verdura. Particularmente en Asia y África, también se consumen brotes, hojas y vainas inmaduros. En Filipinas y África, las semillas secas se utilizan para producir harina de frijoles con alto contenido de proteínas para enriquecer el pan o los fideos.

Después de cosechar las vainas, a veces se alimenta al ganado. En ocasiones, las semillas se utilizan como forraje. Las hojas y los tallos se pueden convertir en heno o ensilaje. El ensilado contiene un 27,3% de materia seca y hasta un 14,2% de nutrientes digestibles, también se cultiva como cobertura de corta duración o como abono verde (Baudoin, 1989; Hernández y León, 1994). En los EE. UU., los frijoles se utilizan tanto frescos y secos se procesan a escala industrial mediante el enlatado y la congelación (Baudoin, 2006).

2.2 Análisis Físico – Químico

Los datos obtenidos mediante los análisis bromatológicos son de importancia para la asimilación de los factores que conllevan las propiedades químicas de los productos alimenticios de forma que se sepan sus capacidades nutritivas (Salazar, 2014). Dentro de los principales objetivos de

la realización de estos estudios está el análisis de los componentes nutraceuticos, el análisis químico cuantitativo de lípidos, nitrógeno y fibra de los productos evaluados (Ramos 2014) Los procedimientos químicos realizados nos muestran el valor nutritivo de un producto, y nos señalan las bases para un control de calidad, y para observar si se cumplen con los estándares establecidos con los requerimientos de mercado (Pineda, 2016).

Dentro de los parámetros evaluados en el análisis químico proximal se encuentra la detetermianción del porcentaje de materia seca que es la disminución del agua contenida en un alimento en dicho alimento. Esto se logra al someterse la muestra a un calor constante moderado, para que el agua contenida en la muestra se evapore y de esta manera únicamente queda la porción de materia seca (Ramírez, 2011).

La proteína es un compuesto orgánico que está formado por polímeros de aminoácidos que están unidos por enlaces peptídicos. Son biomoléculas que están formadas por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, en algunos casos pueden contener azufre, fosforo, hierro, magnesio, cobre, entre otros. Generalmente podemos determinarla en un alimento por el método Kjeldahl, que está basado en la cantidad que contiene de nitrógeno por medio de un proceso de digestión (Bedoya, 2016).

Se refiere al residuo inorgánico generado después de calcinar la materia orgánica. Este parámetro se emplea para determinar la calidad de los alimentos; estas no son generalmente las mismas sustancias inorgánicas que se encuentran en el alimento, gracias a la volatización o las interacciones químicas entre las partes que lo constituyen (Corona, 2016).

La grasa se forma a partir de los hidratos de carbono, constituyen una de las principales fuentes de energía. Representan vehículos de las vitaminas liposolubles (A, D, E y K). se refiere al conjunto de sustancias de un alimento que se extraen con solventes orgánicos (Bedoya, 2016). Se refiere a sustancias que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, las cuales no son digeridas por los procesos del estómago ni del intestino delgado, está formada por celulosas y lignocelulosas provenientes de la pared celular (Bedoya, 2016). Su determinación se basa en el tratamiento secuencial con ácidos, además de álcalis; esto es debido a que gran parte de los

compuestos como la hemicelulosa, lignina, y la celulosa son digeridos (Corona, 2016).

La determinación del extracto libre de nitrógeno es una de las fracciones para la determinación de fibra. Es calculada con base a las demás determinaciones, esto es porque no puede determinarse de manera directa gracias a las diversas sustancias químicas que lo conforman, además que no puede aislarse analíticamente. Dentro de este extracto se encuentra una mezcla de sustancias orgánicas en las cuales no se encuentra ninguna que presente nitrógeno, es una mezcla de almidones, azúcares, hemicelulosa, lignina, además de vitaminas hidrosolubles. Pueden disolverse en las soluciones ácidas y también en las alcalinas (Corona, 2016).

2.3 Caracterización y análisis de semillas

Las semillas son material genético sensible a las condiciones ambientales y presentan deterioro si estas no son cuidadas correctamente, lo cual se ve reflejado en la siembra, el crecimiento y el rendimiento productivo. La calidad comprende características como la pureza varietal y física, la germinación, la sanidad y el vigor. Estos medios de evaluación permiten la siembra de plantas prominentes, sanas y con características únicas de la semilla seleccionada (Marshall y Grace, 1992).

La descripción varietal correcta es necesaria, para poder caracterizar correctamente a los recursos genéticos de los cuales no se tienen registros de semilla criolla (CIAT, 1983). Las características físicas favorables del género *Phaseolus spp.* son claves para obtener cultivos de alta producción, la evaluación de estas características, se realizan mediante pruebas de germinación, vigor alta pureza y calidad física (Lobo *et al.*, 2013). Después del cultivo de las semillas, el manejo de semillas genera cambios físicos, fisiológicos y químicos, por lo que la semilla va perdiendo características de vigor (Guedes *et al.*, 2010). El volumen, forma y características físicas, tiene correlación con la eficiencia del crecimiento debido a sus características para el desarrollo óptimo de estas, debido a su reserva inicial al germinar (Celis Velázquez *et al.*, 2010).

Las semillas de frijol son llamadas semillas ortodoxas (Graham & Ranalli, 1997), debido a que sus características fisiológicas, se pueden secar y almacenar por periodos extendidos de tiempo, sin mermar su vigor germinativo. Uno de los objetivos principales de la conservación y

almacenamiento de semillas es preservar la calidad de las semillas y de los granos cultivados y que estos puedan almacenarse sin perder sus características de viabilidad o su calidad nutricional y por ende su valor comercial.

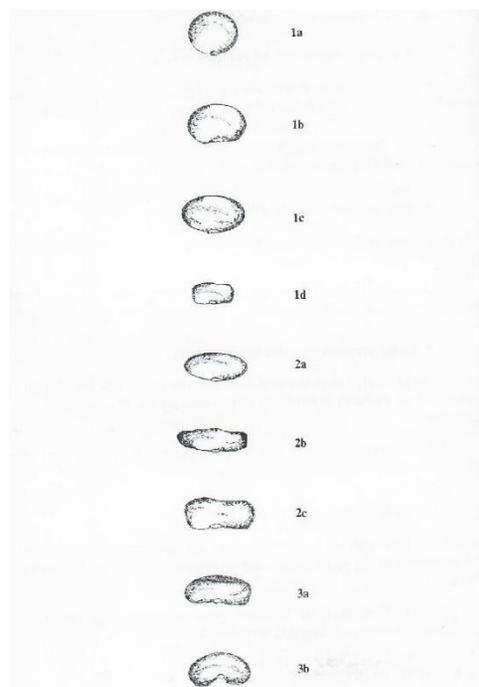


Figura 11. Formas que presenta la semilla de frijol. 1 = esférica (perfil circular); 2 = alargada; 3 = arriñonada. 1a = redonda, 1b = ovoidal, 1c = elíptica, 1d = pequeña, casi cuadrada; 2a = alargada ovoidal, 2b = alargada, ovoide en un extremo y recta en el otro, 2c = alargada, casi cuadrada; 3a = arriñonada y recta en el lado del hilo; 3b = arriñonada y curva en el lado opuesto al hilo.

Figura 7. Determinación de color (A) y forma de semilla (B)

Obtenido de CIAT, (1983).

2.3.1 Importancia de la caracterización

La calidad de cualquier producto es un conjunto de características que el consumidor evalúa para determinar si lo consumido satisface sus expectativas. En la etapa de madurez fisiológica y durante el proceso de llenado de la semilla, su peso aumenta al paso de los días después de la floración, hasta un momento en el que dejan de aumentar y comienzan a decrecer, por lo tanto la calidad de las semillas es el conjunto de cualidades genéticas, fisiológicas, sanitarias y físicas. (CIAT. 1981).

2.3.2 Calidad de la semilla.

Un factor básico muy importante para el éxito de la agricultura moderna es la utilización de variedades con el fin de generar altos rendimientos en granos o forrajes y así poder contribuir con la demanda generada por el mercado, se han desarrollado técnicas de análisis que permiten evaluar la calidad de las semillas para la siembra y que son de interés tanto para la industria semillera como para las instituciones responsables de la certificación, tendiendo un beneficio para el agricultor al determinar el valor de la semilla. La calidad de la semilla es un concepto basado en la valoración de diferentes atributos los cuales mejoran el establecimiento de la planta en campo, el peso de la semilla, está positivamente relacionado con la calidad de semilla (Perez Mendoza et al., 2006).

Por otro lado, la calidad física involucra características tales como: contenido de humedad, peso por volumen y pureza (Moreno, 1996).

Hoy en día resulta de suma importancia para las empresas productoras de semilla y para los productores características tales como; tamaño y forma de la semilla, peso, color así como resistencia o mayor tolerancia a plagas y enfermedades. (Basra, 1995; ISTA, 2005)

2.3.3 Descripción varietal

La descripción varietal correcta es necesaria, para poder caracterizar correctamente a los recursos genéticos de los cuales no se tienen registros de semilla criolla (CIAT, 1983). Las características físicas favorables del género *Phaseolus spp.* son claves para obtener cultivos de alta producción, la evaluación de estas características se realizan mediante pruebas de germinación, vigor alta pureza y calidad física (Lobo *et al.*, 2013). Después del cultivo de las semillas, el manejo de semillas genera cambios físicos, fisiológicos y químicos, por lo que la semilla va perdiendo características de vigor (Guedes *et al.*, 2010).

2.3.4 Características físicas de la semilla

El volumen, forma y características físicas tiene correlación con la eficiencia del crecimiento

debido a sus características (**Cuadro 1**) para el desarrollo óptimo de estas, debido a su reserva inicial al germinar (Celis-Velázquez *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Aspectos relacionados con calidad de semillas.

Calidad	Aspectos
Física	Pureza física y contenido de agua.
Fisiológico	Germinación, vigor y viabilidad.
Fitosanitario	Microorganismos e insectos
Genético	Identidad varietal y pureza física.

Fuente: Porras, (2015).

Por caracterización se entiende la descripción del germoplasma vegetal, así mismo, la caracterización desde el punto de vista agronómico constituye una herramienta para su reconocimiento en campo. La caracterización determina la expresión de caracteres altamente heredables que van desde las características morfológicas, fisiológicas y agronómicas hasta el contenido en proteínas y aceite de las semillas, pasando por los marcadores moleculares (FAO, 2014).

Con condiciones favorables de almacenamiento a las semillas se les permite mantener la viabilidad del germoplasma, sin embargo, aún en condiciones excelentes la viabilidad disminuye cuanto mayor es el periodo de almacenamiento. Por tanto, será necesario evaluar la viabilidad de forma periódica. La prueba de viabilidad inicial deberá llevarse a cabo tan pronto como sea posible antes de que se empaquen y almacenen las semillas, y se realizarán pruebas posteriores a intervalos durante el almacenamiento (FAO, 2014).

Los atributos y características de las especies cultivadas están determinadas por los expertos en las especies o por los encargados de las colecciones, en consulta con los administradores de los bancos de germoplasma (FAO, 2014). Alrededor de ha elaborado una amplia gama de listas de descriptores de cultivos, por ejemplo, los de Bioversity International, y a partir de algunos de ellos también se han generado conjuntos mínimos de descriptores clave para su utilización.

2.3.5 Color de la semilla.

El color de la semilla se atribuye positivamente con restricción a la germinación, debido a los componentes fenólicos en la cubierta seminal (Debeajun *et al.*, 2002). En algunas especies como *Sinapis arvensis* L., se reduce la latencia en semillas rojas, comparadas con semillas negras (Duran y Retamal, 1989).

Las semillas blancas de leguminosas envejecen más rápidamente que las de otro color y germinan primero. En el trigo, la latencia está asociada con una cubierta seminal roja, mientras que en las semillas blancas no hay latencia o es débil (Mares, 1994).

2.4 Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR)

El espectro infrarrojo (IR) mide la frecuencia de vibración de las moléculas para la determinación de grupos funcionales, este se clasifica en el IR cercano (**Figura 8**) debido a que se encuentra a continuación de la región visible del espectro se ubica en el rango de 13000-4000 cm^{-1} , el espectro medio se ubica en el rango 4000-400 cm^{-1} y el IR lejano, se ubica en el rango 400-10 cm^{-1} (Coates, 2000).

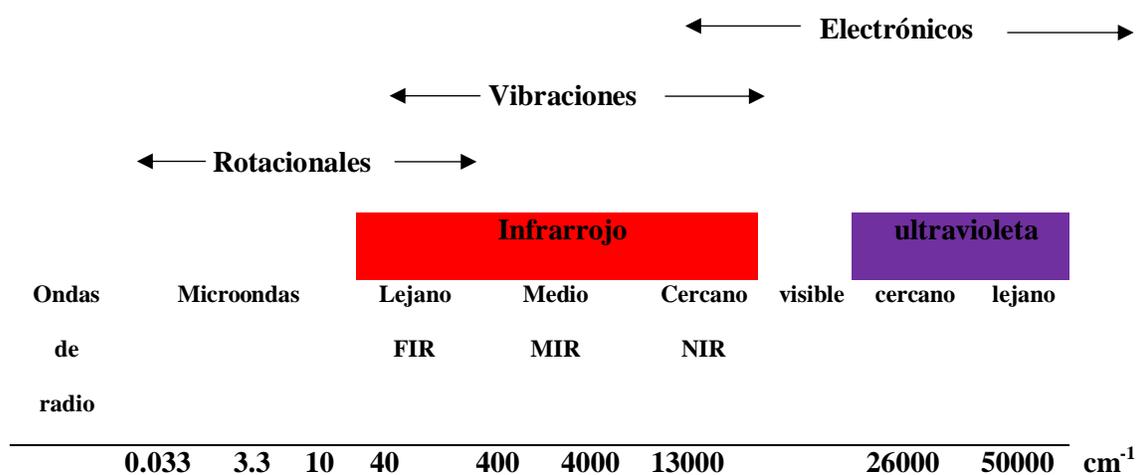


Figura 8. Regiones del espectro electromagnético.

*Basado en (Hollas, 2004).

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica utilizada para caracterizar de biomateriales mediante su huella química. Es simple, reproducible, y no

destruictiva, para el análisis se requieren pequeñas cantidades del material a analizar y proporciona información a nivel molecular que permite la identificación de grupos funcionales y enlaces. Las bandas espectrales en los espectros vibracionales son específicas de la molécula y proporcionan información directa sobre la composición bioquímica (Movasaghi *et al.*, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

El material fue colectado en la región de Tierra Caliente, Guerrero (**Cuadro 2**) durante los meses de Febrero y Abril del 2021. Una vez recolectadas las muestras vegetales fueron transportadas al Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular en el Departamento de Ciencias Básicas de la UAAAN, posteriormente se secaron a 50°C/24 h en una estufa Novatech, y se redujo el tamaño de partícula en un molino Homend, HC-500 a 600 µm (malla No. 30). Se almacenaron en bolsas negras hasta los análisis.

Cuadro 2. Ubicación geográfica de las colectas de *P. Lunatus* en la región de Tierra Caliente, Gro.

Genotipo	Municipio	Localidad	Altitud
Comba Blanca	Tlalchapa	Colonia Cuauhtémoc	400 msnm
Blanca Violenta	San Miguel Totolapan	Valle luz	299 msnm
Floja Ojo Negro	Tlalchapa	Colonia Cuauhtémoc	400 msnm
Muy violenta	San Miguel Totolapan	Valle luz	299 msnm
Pinta Violenta	San Miguel Totolapan	Valle luz	299 msnm

3.2 Métodos para el análisis químico proximal

3.2.1 Determinación de Cenizas

Los materiales y equipos empleados fueron crisoles de porcelana, desecador, pinzas y balanza analítica. Se pesaron los crisoles vacíos, se agregó un gramo de muestra a los crisoles, se pre incineró en un mechero cada una de las muestras contenidas en el crisol hasta que se quemó.

Los crisoles se colocaron dentro de la mufla a 500°C/24 h. Posteriormente, se colocaron en un desecador por 30 minutos.

Finalmente se pesaron en una balanza analítica de 0.0001 g de precisión (**Figura 9**).



Figura 9. Determinación de cenizas.

El porcentaje de cenizas se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{\text{Peso del crisol} + \text{ceniza} - \text{Peso de crisol vacío}}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

3.2.2 Determinación de Proteína Cruda

Los materiales y equipos empleados fueron matraz Kjeldahl de 800 ml, aparato de digestión y destilación Kjeldahl, matraz Erlenmeyer de 500 ml, bureta, ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0.1 N, hidróxido de sodio 45%, ácido bórico 4%, indicador mixto, agua destilada, mezcla de selenio, perlas de vidrio, H₂SO₄ concentrado. Se pesó un gramo de muestra (previamente molida) y se colocó en un matraz Kjeldahl (**Figura 10**), se agregó una cucharada de selenio y seis perlas de vidrio, luego se agregaron 30 ml de H₂SO₄ concentrado, y se llevó al digestor Kjeldahl, la digestión se detuvo cuando existió cambio de color, de café oscuro a verde claro. Posteriormente, se agregaron 300 ml de agua destilada.



Figura 10. Proceso de digestión para determinar proteína cruda

En un matraz Erlenmeyer se agregaron 50 ml de ácido bórico, en seguida se añadieron seis gotas de indicador mixto y se colocó la manguera del destilador Kjeldahl dentro del matraz. Se agregaron 110 ml de hidróxido de sodio al 45%, una cucharada de zinc, se colocaron en el aparato de destilación Kjeldahl, captando un volumen de 300 ml, una vez obtenido el volumen, se realizó la titulación de las muestras, considerando un blanco.

Para la determinación del porcentaje de proteína, se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\% N = \frac{(ml H_2SO_4 \text{ gastado en muestra} - ml H_2SO_4 \text{ gastados en blanco})(normalidad del ácido)(0.014) \times 100}{gr \text{ de muestra}}$$

$$\% \text{ Proteína Cruda} = \% N \times 6.25$$

3.2.3 Determinación de Extracto etéreo o grasa

Se utilizó un aparato extractor tipo Soxhlet, dedales de asbesto, matraces bola fondo plano y boca esmerilada, estufa, pinzas, balanza analítica, desecador, hexano, perlas de vidrio, papel filtro y algodón.

Los matraces bola de fondo plano se colocaron en la estufa por 12 horas, para obtener un peso constante. En un papel filtro se pesaron tres g de muestra (molida) y se colocaron en un dedal de asbesto, en el matraz bola de fondo plano y se le agregaron 250 ml de hexano y se colocó el dedal con la muestra en el sifón Soxhlet, junto con el matraz bola y refrigerante; se encendió la parrilla y se dejó por 6 horas (**Figura 11**).



Figura 11. Determinación de extracto etéreo

Pasado este tiempo, se retiró el dedal para recuperar el solvente y finalmente se colocó el matraz en la estufa, se dejó 12 horas, se sacó, enfrió y peso. La fórmula para determinar el extracto libre de nitrógeno es la siguiente.

$$\%EE = \frac{\text{peso de matraz} + \text{grasa} - \text{peso de matraz vacío} \times 100}{\text{gr de muestra}}$$

% EE = porcentaje de extracto etéreo.

3.2.4 Determinación de Fibra cruda

El material y equipo que se utiliza es un digestor Labconco, vasos de Berzelius de 600 ml, ácido sulfúrico 0.255N, hidróxido de sodio 0.313 N, agua destilada, filtros de tela, embudos de vidrio. Se pesaron 2 g de muestra desengrasa y se colocaron en el vaso de Berzelius. Después se agregaron 100 ml de ácido sulfúrico 0.255 N y se colocó el vaso en la parrilla (**Figura 12**).



Figura 12. Determinación de fibra cruda

Al momento de estar la muestra en ebullición, se consideró un tiempo de 30 minutos, al cabo del tiempo, la muestra se filtró y lavó con agua caliente; se vació la muestra en el vaso, y se agregaron 100 ml de hidróxido de sodio 0.313 N. La muestra se llevó a una estufa de secado por 12 horas y se pesó; después, la muestra se colocó en un crisol y se colocó en una mufla durante 2 horas, hasta obtener cenizas, y finalmente se pesó.

La fórmula empleada para calcular el porcentaje de fibra cruda fue la siguiente:

$$\%FC = \frac{\text{peso del crisol} + \text{muestra seca} - \text{peso del crisol} + \text{cenizas}}{\text{gr de muesyta desengrasada}} \times 100$$

%FC = porcentaje de fibra cruda.

3.2.5 Determinación de Extracto libre de nitrógeno (ELN)

El ELN se calcula por diferencia, que corresponde a los azúcares, el almidón y gran parte del material clasificado como hemicelulosa. El ELN es necesario para realizar el cálculo total de nutrientes digestibles (TND). Se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} \% \text{ de E.L.N.} = & \% \text{ cenizas} + \% \text{ extracto etéreo} + \% \text{ proteína cruda} \\ & + \% \text{ fibra cruda} - 100 \end{aligned}$$

% de E.L.N. = porcentaje de extracto libre de nitrógeno.

3.3 Extracción y purificación de la muestra

De acuerdo con lo reportado por Ascacio-Valdés *et al.* (2010), se pesaron 20 g de muestra deshidratada (50°C/24 h) y pulverizada (tamiz No. 30) Se colocaron en un vaso de precipitado con 100 mL de agua (relación 1:20). La extracción se llevó a cabo a 60 °C/30 min. Después, el extracto se filtró con papel Whatman #41 para eliminar las partículas de gran tamaño. Una columna cromatográfica con Amberlita XAD-16 fue usada para purificar el extracto; primero, se usó agua como eluyente para descartar compuestos indeseables, y después, se usó etanol como eluyente para recuperar la fracción rica en polifenoles. El solvente (EtOH) fue eliminado por evaporación y los compuestos fenólicos fueron recuperados como un polvo fino. La muestra fue guardada en recipientes ámbar y conservada en refrigeración hasta su uso.

3.4 Calidad física de la semilla

3.4.1 Caracterización morfológica

Se tomaron 10 semillas de cada genotipo analizado; (CB), (CBV), (CFON), (CMV) y (CPV), las cuales por separado se hizo una captura de imagen para determinar sus características morfológicas de la semilla, utilizando un software Fiji/ImageJ como herramienta para el proceso y análisis de las imágenes digitales. A través de esta tecnología se pueden conocer diferentes

tipos de parámetros morfológicos y de cuantificación de fluorescencia, permitiendo obtener información crucial para la interpretación de diferentes estudios científicos.

3.4.2 Tamaño de semilla

Para la medición de esta variable, los genotipos se midieron con el uso de un vernier digital de 150 mm de la marca TRUPER, obteniendo los valores de diámetro polar (DP) del hilio al extremo contrario, diámetro ecuatorial (DE) del lado del embrión al extremo opuesto de este y espesor (E) de la intersección del DE x DP hacia la intersección contraria, como se muestra en la siguiente **Figura 13**.

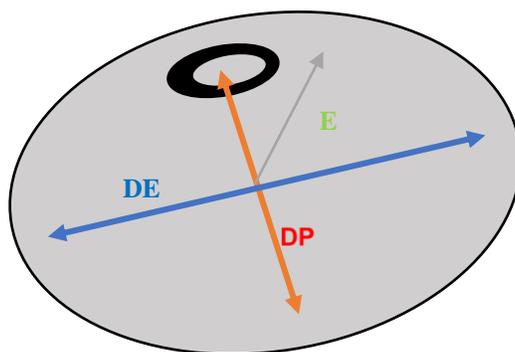


Figura 13. Medición de semilla

*Diámetro ecuatorial (DE), Diámetro polar (DP) Y espesor (E).

3.4.3 Color de testa de la semilla

Para la determinación del color de testa de la semilla se realizó con el apoyo de una gama de colorimetría, utilizada en la tecnología de semillas, para diferenciar color (CIAT, 1983), tomando una muestra al azar de ocho semillas por cada genotipo, y se procedió a buscar entre la gama el color análogo de cada una de las semillas (**Figura 14**), registrando el número colorimétrico correspondiente.

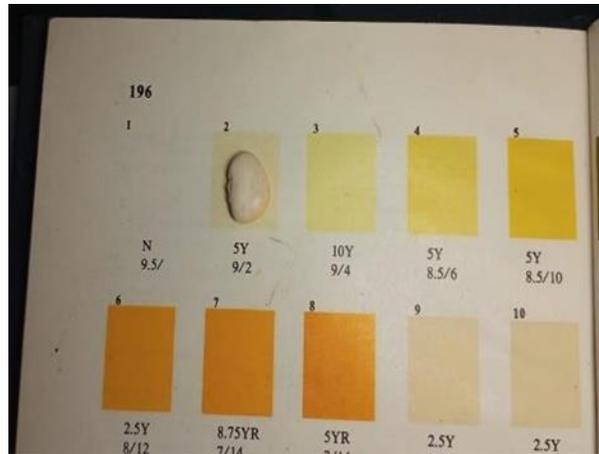


Figura 14. Determinación del color en la semilla

3.4.4 Color y tipo de hilio

En la coloración del hilio, nuevamente se utilizó la gama de colorimetría, para diferenciar color (C), en ocho semillas por cada genotipo, y se procedió a buscar entre la gama el color análogo de cada una de las semillas, registrando el número colorimétrico correspondiente. Además, se observó si la coloración del hilio era uniforme, identificado como hilio perfecto (HP), o si la tonalidad presentaba una variación de color, se consideró como hilio imperfecto (HI) (Figura 14).

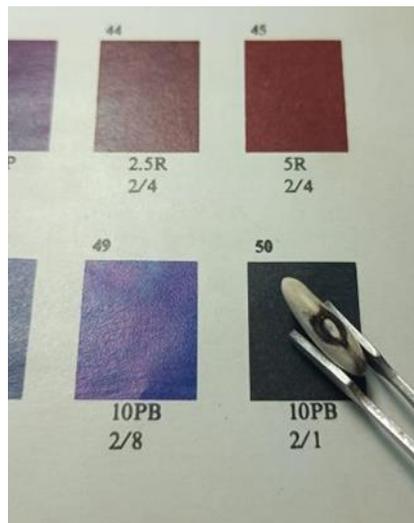


Figura 15. Dterminación del color y tipo de hilio

3.4.5 Brillantez de la semilla

Se observó mediante una lámpara de escritorio una semilla de forma que si reflejaba la luz (**Figura 16**) se le denominó brillante y si no la refleja se le consideró opaca (CIAT, 1983).



Figura 16. Prueba de brillantez de semilla

3.4.6 Peso de Mil Semillas

Se consideró la metodología descrita por la ISTA (2018), se tomaron al azar ocho repeticiones de 100 semillas de cada material, por triplicado, el conteo se realizó manualmente; cada una de las repeticiones se pesó en gramos en una balanza analítica de 0.0001 g de precisión, se promediaron las repeticiones y se multiplicó por 10, obteniendo el peso mil semillas (**Figura 17**).

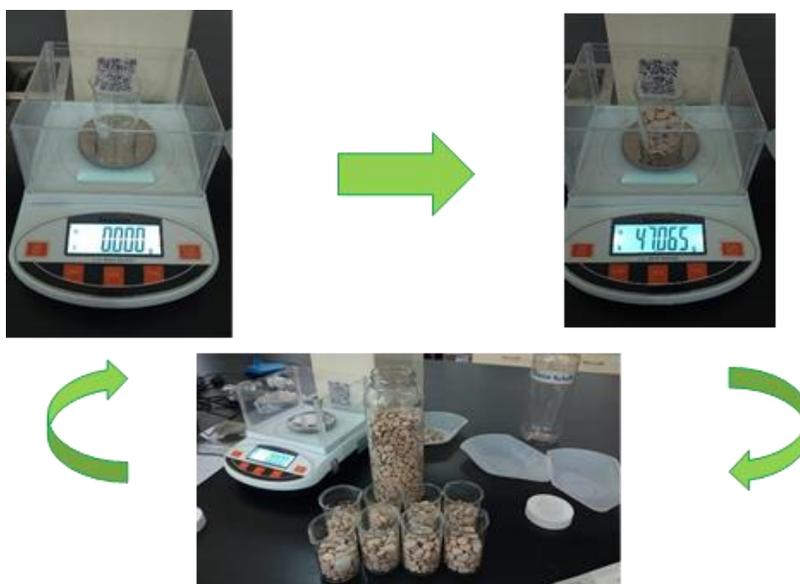


Figura 17. Prueba de peso de mil de semillas

Así mismo, para determinar si las muestras de cada genotipo eran homogéneas, se utilizaron los datos de la prueba, para calcular la varianza (S^2), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV) de la siguiente manera:

$$S^2 = \frac{(\sum x^2) - (\sum x)^2}{n(n-1)}$$

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

$$S = \sqrt{S^2}$$

Donde:

x = peso en gramos en cada repetición.

N = número de repetición

\sum = Operador sumatoria.

S = Desviación estándar

S^2 = Varianza

3.4.7 Peso volumétrico

Para determinar el peso volumétrico de semillas se realizó conforme el principio de un contenedor de volumen conocido. Colocando sobre una charola el contenedor y dejando caer libremente la semilla, hasta sobrepasar el borde, en seguida se eliminó el exceso mediante el paso en “zig-zag” con una regla de madera (Figura 18).

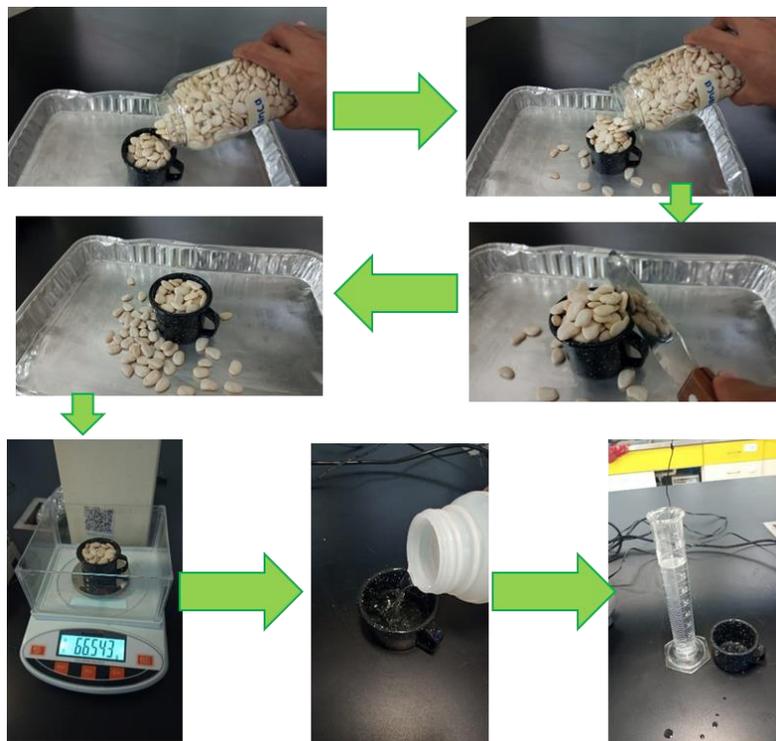


Figura 18. Determinación de peso volumétrico

Una vez realizada la operación de llenado y quitar el exceso de semilla, se pesó la semilla y se calculó el resultado considerando el volumen y peso para registrar el dato en Kg/HL, conforme a la ISTA (2018).

3.5 Análisis Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

El análisis se realizó utilizando un FTIR Agilent Cary 630 acoplado a un cristal de seleniuro de zinc (ZnSe) ATR. El extracto fenólico seco purificado se depositó sobre toda la superficie del lector y se aseguró mediante la prensa equipada. La lectura se realizó mediante el programa de PC MicroLab en el rango espectral de 4000 a 650 cm^{-1} , con un ciclo de 32 barridos con una resolución de 2 cm^{-1} . El análisis del espectro y los grupos funcionales detectados se realizó con el programa MicroLab Expert y la trama se construyó con el programa OriginPro 8.

3.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de cada determinación físico-química y de calidad de semilla de los genotipos estudiados, se analizaron mediante un diseño de bloques al azar, determinando una prueba de comparación de media mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$), a través del programa Statistica versión 10.0 (Copyright © 2022, Informer Technologies. Inc)

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis químico proximal

El análisis proximal comprende las determinaciones que se realizan más frecuentemente para conocer la composición de los macro componentes presentes en los alimentos y tejidos vegetales e incluyen la determinación de humedad, cenizas, extracto etéreo (grasa cruda), proteína total, fibra dietética y carbohidratos asimilables (Vásquez, & Fernández, 2020).

En los resultados del porcentaje de **cenizas**, se encontró una diferencia significativa al 0.05%, entre los genotipos estudiados; indicando tres grupos estadísticos en el análisis de comparación con Tukey al 0,05%, teniendo el mayor porcentaje el genotipo **CBV** con 4.90 %, formando un solo grupo estadístico (**Cuadro 3**); a diferencia del genotipo **CMV**, quien presentó el menor valor de 4.16%, pero en el mismo grupo que los genotipos **CPV** y **CB**, quienes fueron estadísticamente iguales con valores de 4.40 y 4.23%, respectivamente.

Debido a la importancia de las cenizas en el área alimentaria, por representar el contenido total de minerales, materia seca orgánica y micro elementos en el grano, posiblemente puede indicar su nivel de madurez fisiológica en cada genotipo, como lo han encontrado en *Phaseolus vulgaris* L. (Morales et al., 2017), siendo precisamente el genotipo **CBV** con la mayor acumulación, en comparación del resto de combas estudiadas.

Sin embargo, los resultados obtenidos del estudio indicaron que en esta especie *Phaseolus lunatus* de la región Tierra Caliente, los valores oscilan entre 4.19 a 4.90 %, valores similares a los reportados por Paucell (2010), siendo de 3.99%, pero superiores a los obtenidos por Marrugo et al. (2012), quienes registraron valores de 3,76% de cenizas.

En la determinación de **proteína cruda**, los resultados indicaron una diferencia significativa de 0.05%, destacando el genotipo **CMV** con el mayor valor de 28.18±0.02 (**Cuadro 3**); seguido de **CB** con 27.50 %; siendo superiores a los reportados por Paucell, (2010) en *Phaseolus vulgaris* y *P. Lunatus* (23.24 y 23.75%, respectivamente) y Marrugo y colaboradores (2012), que reportaron un porcentaje de 21.28±0.36.

Cuadro 3. Resultados de la prueba de medias con Tukey ($p < 0.05$) en los análisis químicos proximal de los genotipos de *Phaseolus Lunatus*.

Genotipo	Cenizas		Proteína		Grasas		Fibra cruda		Extracto L.N.	
CB	4.23±0.06	ab	27.50±0.02	c	1.13±0.23	a	2.78±1.0	ab	87.44±1.21	ab
CBV	4.90±0.10	c	23.43±0.00	a	1.41±0.17	a	2.41±0.46	ab	87.51±0.41	ab
CFON	4.43±0.12	b	23.81±0.05	a	2.95±0.77	b	3.18±0.32	c	85.61±1.08	a
CMV	4.16±0.06	a	28.18±0.02	d	1.83±0.76	ab	2.71±0.92	ab	86.76±1.33	ab
CPV	4.40±0.10	ab	25.25±0.02	b	1.21±0.15	a	1.86±0.52	a	88.47±0.53	b

*Las letras iguales significan que no hay diferencia estadística. Las pruebas fueron realizadas con una significancia a $p < 0,05$.

CB= Comba blanca; CBV= Comba blanca violenta; CFON= Comba floja ojo negro; CMV= Comba muy violenta; CPV= Comba pinta violenta.

Sin embargo, los genotipos **CBV** y **CFON** resultaron con valores de proteína de 23.43 y 23.81 %, respectivamente, similares a estos autores.

En análisis estadístico para la variable **extracto etéreo** se presentó una diferencia significativa al 0.5 %, donde el genotipo **CFON** mostró el mayor contenido de grasa con 2.95 % (**Cuadro 3**), seguido de **CMV** con 1.83 %; mientras que los genotipos **CB**, **CBV** y **CPV**, presentaron valores estadísticamente iguales de 1.13 a 1.41 %; lo que indica estos materiales genéticos de la región de Tierra Caliente son superiores a los materiales registrados por Marrugo y colaboradores (2012) que fue de 0.95 %.

Con respecto a la variable **fibra cruda**, el análisis de datos encontró una diferencia significativa entre los materiales evaluados, donde el genotipo **CFON** sobresalió en presentar el mayor valor de 3.18 %, seguidos los genotipos **CB**, **CBV** y **CMV**, quienes resultaron en el mismo grupo estadístico con valores similares de 1.86 a 2.78 % (**Cuadro 3**), y por último el genotipo **CPV** que presentó el menor porcentaje (1.86 %). Los genotipos del estudio muestran una marcada diferencia con respecto al estudio hecho por Marrugo y colaboradores (2012), donde ellos reportaron porcentajes mayores en fibra cruda de 4.09 %.

Aunque en los genotipos del presente estudio presentará los valores aparentemente bajos, es importante mencionar que, el contenido de fibra cruda en las especies vegetales no debe superar el 10%, pues reduce la asimilación de nutrientes y afecta la digestibilidad de quienes las consumen (Aponte, *et al.* 2013). Por lo que podemos considerar a estos materiales con un buen valor en fibra cruda.

Además, se puede interpretar que los materiales de *Phaseolus lunatus* de la región Tierra Caliente, resultaron contener estos valores posiblemente por su avance en su madurez, ya que la fibra cruda, también puede variar en las plantas debido a la edad, a menor edad se presenta mayor concentración (Cevallos *et al.*, 2008).

En el análisis estadístico de los datos obtenidos para el **extracto libre de nitrógeno (ELN)**, indicaron una diferencia significativa al 0.05%, tenido valores desde 85.61 hasta 88.47 % (**Cuadro 3**).

Generalmente los resultados de ELN se reportan con valores altos, debido a que representan a los azúcares y almidón, lo cual muestra que los genotipos del estudio son ricos en estos compuestos. Sin embargo, es de señalar que la acumulación de compuestos químicos en las plantas está fuertemente influenciada por algunos factores como las condiciones climáticas, la estación y la variabilidad genética, de tal modo, que los resultados de esta variable de los diferentes *Phaseolus lunatus* de la región Tierra Caliente, pudieron haber estado influenciados y presentar variación en los diferentes análisis evaluados (Wielgolaski 2001).

4.2 Calidad de semilla

En la caracterización morfológica de los genotipos de *Phaseolus lunatus* de la región Tierra Caliente, se determinó que los cinco genotipos de Comba blanca (B), blanca violenta (BV), muy violenta (MV), pinta violenta (PV) y floja ojo negro (FON), exhiben predominantemente una forma ovoide (**Figura 19**).

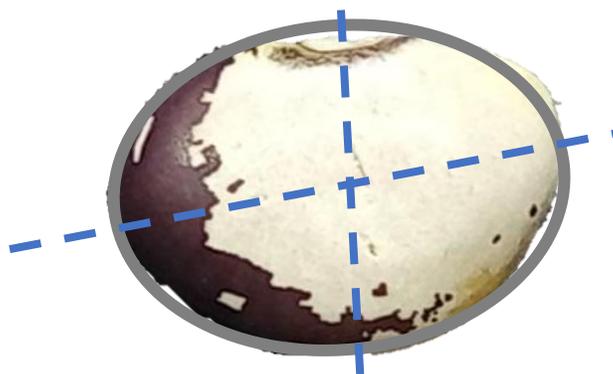


Figura 19. Forma de la semilla de *Phaseolus lunatus*

Con respecto al **tamaño de la semilla**, se encontró que el diámetro polar de los genotipos estudiados se mantuvo en el rango promedio entre 9.10 y 10.76 mm (**Cuadro 4**), lo que indica que son más grandes a otros genotipos de la especie *Phaseolus lunatus*, del Valle Central de Costa Rica, donde se reportaron valores entre 5.76 y 7.79 mm (Vargas *et al.*, 2003).

Mientras que, en el diámetro ecuatorial, los materiales se caracterizaron por presentar valores desde 13.27 hasta 14.89 mm y en el espesor varió de 4.28 a 4.51 mm (**Cuadro 4**), valores superiores a los registrados en las poblaciones de *Phaseolus lunatus*, del Valle Central de Costa

Rica (Vargas *et al.*, 2003), que presentaron un ancho de 5.09 a 6.62 mm, y de espesor entre 2.97 a 3.44 mm; teniendo un tamaño de semilla mucho más pequeño que los genotipos de *Phaseolus lunatus* de la región Tierra Caliente de México.

De igual manera, en este estudio morfológico se lo logró identificar entre los genotipos a **CFON**, quien sobresalió con la característica de mayor diámetro polar con un promedio de 10.76 mm (**Cuadro 4**); mientras que el genotipo **CB** destacó por el mayor diámetro ecuatorial con un promedio de 14.89 mm; y en la característica de mayor espesor de semilla, el genotipo **CBV** con 4.59 mm (**Figura 19**).

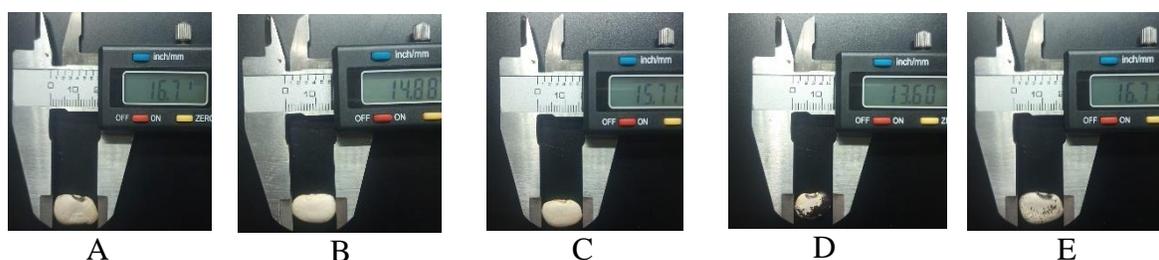


Figura 20. Estudio morfológico en el tamaño de la semilla de *Phaseolus lunatus*;

A) Comba floja ojo negro; B) Comba blanca; C) Comba blanca violenta; D) Comba pinta violenta; E) Comba muy violenta.

En cuanto a la característica de **color de testa de la semilla**, en la mayoría de los genotipos de *Phaseolus lunatus* de la región Tierra Caliente, existió una predominancia de color blanco según la gama de colorimetría (**Cuadro 4**), teniendo el genotipo **CB** un color 5Y 9/2, mientras que los genotipos **CFON**, **CPV** y **CBV** se caracterizaron por un color blanco amarillento de 2,5Y 8/4 y; el genotipo **CMV** se identificó con un color blanco amarillento de 2,5Y 8.5/4, según la escala colorimétrica.

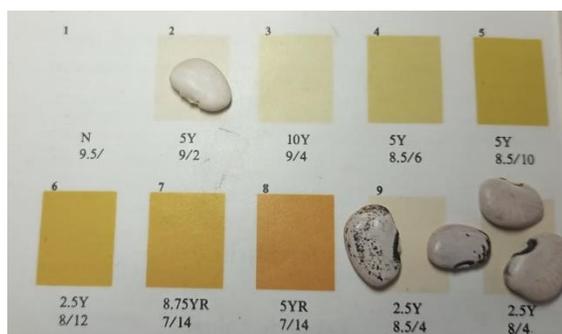


Figura 21. Estudio morfológico con respecto al color de semilla de *Phaseolus lunatus*;

Cuadro 4. Caracterización morfológica y calidad física de semilla

Genotipo	Forma	Color testa	Color del hilo	Brillantez	Tipo de hilo	Diámetro polar (mm)	Diámetro ecuatorial (mm)	Espesor (mm)	Peso de mil semillas (g)	Peso volumétrico (Kg/Hl)
Muy violenta	Ovoide	2.5Y 8.5/4	10 PB 2/1	Brillante	Perfecto	10.31 (±) 0.53	14.70 (±) 0.96	4.37 (±) 0.03	48.30 (±) 1.38	69.32 (±) 1.19
Pinta violenta	Ovoide	2.5Y 8/4	10 PB 2/1	Brillante	Perfecto	9.10 (±) 0.47	13.27 (±) 2.14	4.51 (±) 0.27	45.94 (±) 0.96	73.01 (±) 0.16
Floja ojo negro	Ovoide	2.5Y 8/4	10 PB 2/1	Brillante	Perfecto	10.76 (±) 0.51	14.59 (±) 0.50	4.38 (±) 0.02	47.38 (±) 1.75	74.32 (±) 0.17
Blanca violenta	Ovoide	2.5Y 8/4	10 PB 2/1	Brillante	Imperfecto	10.05 (±) 0.15	13.85 (±) 0.47	4.59 (±) 0.07	46.08 (±) 0.99	73.29 (±) 0.46
Blanca	Ovoide	5Y 9/2	5Y 9/2	Brillante	Perfecto	10.27 (±) 0.57	14.89 (±) 1.3	4.28 (±) 0.16	50.68 (±) 1.91	70.49 (±) 0.94

En la variable de **brillantez de la semilla**, las cinco Combas de *Phaseolus lunatus* evaluadas se caracterizaron por presentar brillantez en su testa, además de contener un color de hilo 10 PB 2/1 de tipo perfecto a acepción del genotipo **CBV**, que se caracterizó como imperfecto (**Cuadro 4**).

Con respecto a la calidad física se encontró que, en la variable de **peso de mil semillas**, los materiales genéticos presentaron una variación entre ellos, donde el genotipo CB obtuvo el mayor valor con 50.68 g, seguido por el genotipo **CMV** con 48.3 g; estos resultados eran de esperarse, pues son materiales que presentaron mayor tamaño en el estudio morfológico. Sin embargo, como es una especie que tiene un crecimiento indeterminado (Delgado-Salinas *et al.*, 1999), es posible que el número y llenado de la semilla este causando esta variación entre genotipos (Rocha y Stephensen, 1995), aunque otros autores mencionan que el tamaño de las semillas es una característica estable en las plantas (Harper, 1977), aspecto que se encontró en este estudio; pero en otras investigaciones contradicen esta teoría ya que afirman que puede variar entre poblaciones y dentro de las plantas de una misma especie (Vargas *et al.*, 2003, Sakai y Sakai, 1996),.

Por otro lado, los genotipos evaluados mostraron una variación en el **peso volumétrico** de la semilla, donde el genotipo **CFON** presentó el mayor valor con 74.32 Kg/Hl, seguidos los genotipos **CPV** y **CBV** con pesos de 73.01 a 73.29 Kg/Hl; mientras que **CMV** y **CB** registraron los pesos más bajos de 69.32 y 70.49 Kg/Hl, lo que era de esperarse ya que es una variable que puede reflejar un resultado inverso al peso de mil semillas, entre mayor es el tamaño de la semilla menor es la cantidad de semilla contenida en un volumen determinado, ya que por principio, existe mayor espacio entre las semilla en dicho contenedor (Moreno, 1996).

4.3 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

En estudios en los que se analizaron espectros FTIR de *Phaseolus lunatus* se reportaron anchos de banda entre los 3000-3600 cm^{-1} (**Figura 22**) y señales con absorbancias superiores a 0.05 abs en 2950 cm^{-1} de especies criollas de comba (Betancur *et al.*, 2001). La señal de 2923 cm^{-1} concuerda con estudios anteriores. En esta señal se han reportado asociaciones según lo reportado por Okekunle *et al.*, (2020), en el que se encuentra correlacionada el rango de 2923

cm^{-1} reportado en la señal comprendida entre los $3000\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$ que responden a la clase de compuestos de los alcanos de la cadena corta del grupo funcional C-H.

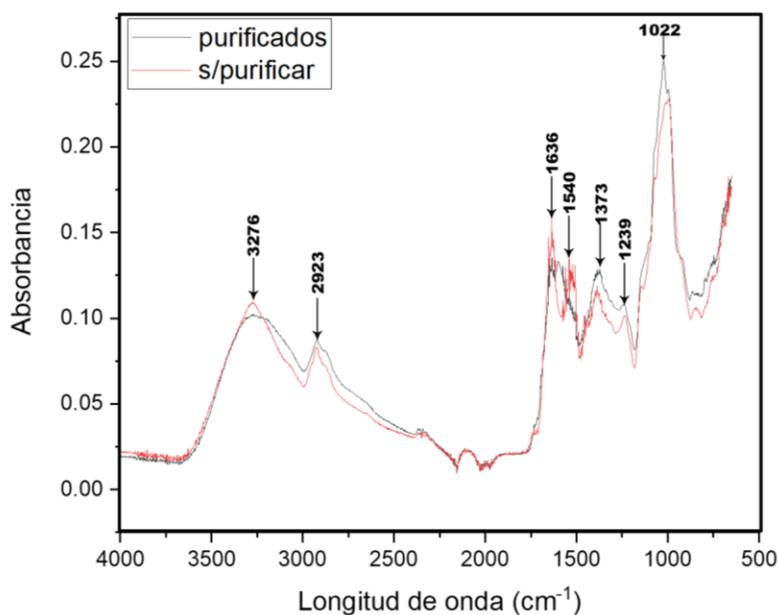


Figura 22. Espectro infrarrojo de muestra con y sin purificar de polifenoles de comba.

Datos publicados por Vilanova & Canosa (2012) relacionados con el género *Phaseolus*, asocian a los alcanos con los hidrocarburos aromáticos resultado de la descomposición oxidativa de los ácidos grasos, considerando esto como el medio aromático de la semilla. La longitud de onda considerada entre los $1650\text{-}1426\text{ cm}^{-1}$ son asociadas al almidón (Okekunle *et al.*, 2020). El pico señalado en los 1636 cm^{-1} corresponde a alcanos conjugados asociados. Los almidones encontrados en estos rangos fueron reportados Olayinka *et al.*, (2011) como procedente de grupos carbonilo y carboxilo formados durante procesos oxidativos.

Algunas discrepancias encontradas entre los estudios realizados por Betancur *et al.*, (2001) y los reportados en este estudio corresponde a las longitudes $861, 762$ y 713 cm^{-1} en la que existió una variabilidad, cuya señal respondía al anillo de la piranosa, la cual está presente en las unidades estructurales básicas de las leguminosas que presentan esqueleto de B-D-manopiranosas las cuales cumplen funciones de reserva energética en las semillas (Manzi, 1984).

V. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró el potencial que tiene la semilla de comba *Phaseolus lunatus* como fuente de alimento. De los genotipos estudiados el que presenta características físico-químicas de mayor interés es el Comba Floja Ojo (CFON) manifestando un mayor valor nutricional en el porcentaje de grasa y fibra, con un buen contenido de fibra cruda.

Los cinco genotipos de *Phaseolus lunatus* evaluados, se caracterizan morfológicamente por tener una forma ovoide, con diferente color de testa, teniendo CB un color banco 5Y 9/2; CFON, CPV y CBV un color blanco amarillento de 2.5Y 8/4; y CMV de 2.5Y 8.5/4.

Los cinco genotipos de *Phaseolus lunatus* evaluados, presentan brillantez en la testa, con hilio perfecto, a excepción del genotipo CBV que tiene un hilio imperfecto. el genotipo CFON es de mayor diámetro polar (10.76 mm) en comparación al resto de los genotipos. Igualmente, CB se caracteriza por tener mayor diámetro ecuatorial (14.89 mm); mientras que CBV es de mayor espesor (4.59 mm).

Los genotipos de *Phaseolus lunatus* evaluados, varían en la calidad física, sobresaliendo el genotipo CB con el mayor peso de mil semillas (50.68 g) y a CFON en el peso volumétrico (74.32 Kg/Hl).

Con base en el análisis FTIR, la “comba” presentó picos en el rango comprendido entre 3000-2840 cm^{-1} asociados a alcanos de la cadena corta del grupo funcional C-H. En 1650-1426 cm^{-1} se detectó presencia de almidón. El pico 1636 cm^{-1} responde a alcanos conjugados.

El rango de los 1550-1500 cm^{-1} está asociado a compuestos nitrogenados encontrados en los 1540 cm^{-1} . Entre los 861, 762 y 713 cm^{-1} responde a anillos de la piranosa, presente en la unidad estructurales básicas de las leguminosas que presentan esqueleto de B-D-manopiranosas.

VI. LITERATURA CITADA

- Basra, A. S. 1995. Seed quality; basic mechanisms and agricultural implications. Basra, A. S. (ed.) Food Products Press. Preface. New York, USA.
- Baudoin JP, (2006). Phaseolus lunatus L. PROTA 1: Céréales y legumbres / Céréales et légumes secs [ed. por Brink, M. \ Belay, G.]. Wageningen, Países Bajos: PROTA.
- Baudoin JP, Degreef J, Hardy O, Janart F, Zoro Bi I, 1998. Desarrollo de una estrategia de conservación in situ para poblaciones silvestres de frijol lima (Phaseolus lunatus L.) en el valle central de Costa Rica. En: Owens SJ, Rudall PJ, Eds. Biología de la reproducción. Kew, Reino Unido: Royal Botanic Garden Press, págs.417-426.
- Betancur, D. A., Ancona, L. A. C., Guerrero, R. I., Camelo Matos, G., & Ortiz, D. (2001). Physicochemical and functional characterization of baby lima bean (Phaseolus lunatus) starch. *Starch-Stärke*, 53(5), 219-226.
- Betancur, D. A., Ancona, L. A. C., Guerrero, R. I., Camelo Matos, G., & Ortiz, D. (2001). Physicochemical and functional characterization of baby lima bean (Phaseolus lunatus) starch. *Starch-Stärke*, 53(5), 219-226.
- Bradford KJ, Nonogaky H (2007) Seed development, dormancy and germination. Blackwell publishing, oxford, UK, 307 pp
- CABI, 2021. Phaseolus lunatus. In: Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. <https://www.cabi.org/isc>
- Cevallos, J. H. A., Guerrero, F. C., Zamora, G. Q., Murillo, R. L., Valdez, O. D. M., Guerra, I. E., Montes, S. Z., Garaicoa, D. R., Ruiz, J. V., & Mendoza, E. P. (2008). Comportamiento agronómico y composición química de tres variedades de Brachiaria en diferentes edades de cosecha. *Revista Ciencia y Tecnología*, 1(2), 87-94.
- Ciurczak, E. W.; Drennen, J. K. (2002). Pharmaceutical and Medical Applications of Near-Infrared Spectroscopy, Marcel Dekker.

- Coates, J. (2000). Interpretation of infrared spectra, a practical approach. Citeseer.
- Davies, M. Garrigues, S.; Gallignani, M. (1981). Anal. Chim. Acta 261.
- Debeajun, I., L. Kloosterziel M., and M. Koorneef. 2002. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 122: 304–414.
- Duran, J. M., and N. Retamal. 1989. Coat structure and regulation of dormancy in *Sinapis arvensis* L. seeds. J. Plant Physiol. 135: 218–222.
- Everson L. Pruebas Especiales de Laboratorio. Unidad de Semillas CIAT. 1981.
- FAO. 2014. Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Edición revisada. Roma.
- FAO. 2018. Legumbres. Pequeñas semillas, grandes soluciones. Ciudad de Panamá. 292 p.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G (2006) Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist 171, 501-523.
- Fuentes y M. Duran Lengua., Y. M. L. P. M. C. E. T. (Ed.). (2014). Potencial nutricional de tres cultivares de frijol Zaragoza (*Phaseolus lunatus* L.) y estimación de su digestibilidad “in vitro”. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 314-326.
- García-Agustín, P. y E. Primo-Millo. 1993. Germinación de semillas en Fisiología y Bioquímica Vegetal. J. Azcon-Bieto; M. Talon (ed.) Interamericana Mcgraw-Hill 419-434 p.
- Gilbert, A. S. (1999). Vibrational, Rotational and Raman Spectroscopy, Historical Perspective, Academic Press. en Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, G. Tranten, J. Holmes, J. Lindon (Eds.), Elsevier, 2000, 2422-2432.
- Global Biodiversity Information Facility, 2021 disponible en: <https://www.gbif.org/es/species/5350438>

- Hernández JE Bermejo, León J, 1994. Cultivos desatendidos: 1492 desde una perspectiva diferente. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), xxii + 341 págs.
- Hernández L., A. y Carballo C., A. 1997. Pruebas de germinación y vigor en semillas de maíz de diferentes áreas de adaptación. *Agrociencia*. 31(4):397-403.
- International Seed Testing Association (ISTA). 2005. International rules for seed testing. Seed Sci. Tech.
- Julio César López Calderón* , Beatriz Martínez Valencia *, Raúl Delgado Macuil, Valentín López Gayou, Miguel Ángel Villalobos López, Analilia Arroyo Becerra. (2011). Análisis mediante espectroscopia de infrarrojo, sobre el efecto del estrés hídrico en frijol negro jamapa (*Phaseolus vulgaris L.*). 2022, de XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería Sitio web:
<https://smbb.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/II/carteles/CII-42.pdf>
- Lian, L.-Y., & Roberts, G. (2011). Introduction. *Protein NMR Spectroscopy: Practical Techniques and Applications*, 1–4. doi:10.1002/9781119972006.ch
- López-Alcocer, JDJ, Lépiz-Ildefonso, R., González-Eguiarte, DR, Rodríguez-Macías, R., y López-Alcocer, E. (2016). Variabilidad morfológica de *Phaseolus lunatus L.* silvestre de la región occidental de México. *Revista fitotecnia mexicana* , 39 (1), 49-58.
- Manzi, A. E. (1984). *Estudio químico del endosperma de la semilla de la leguminosa* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Mares D., J. 1994. Mechanism and genetic control of dormancy in wheat. *In: Proceedings 1st International Symposium on Plant Dormancy*. August 4–6, 1994. Corvallis, OR. pp: 39.
- Martínez-Castillo J, Zizumbo-Villarreal D, Gepts P, Colunga-GarcíaMarín P, 2007. Flujo génico y estructura genética en el complejo silvestre-maleza-domesticado de *Phaseolus*

- lunatus L. en su centro mesoamericano de domesticación y diversidad. *Crop Science*, 47 (1): 58-66.
- Matos C., Zúñiga, D. 2002. Comportamiento de cepas nativas de rizobios aisladas de la costa de Perú en dos cultivares de pallar (*Phaseolus lunatus*). ResearchGate. Pag.2-8.
- Milošević, M.; Vujaković, M. and Karagić, D. 2010. Vigour tests as indicators of seed viability. *GENETIKA*, Vol. 42, No. 1, 103-118. DOI: 10.2298/GENSR1001103M.
- Morales M, Peña C, García A, Aguilar G, Kohashi J. 2017. Seed and seedlings physical characteristics and seeds germination of wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their progeny. *Agrociencia* ; 51: 43-52.
- Moreno, M. E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. 3ra. ed. UNAM. México, D. F. 393 p
- Okekunle, M. O., Adebowale, K. O., Olu-Owolabi, B. I., & Lamprecht, A. (2020). Physicochemical, morphological and thermal properties of oxidized starches from Lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Scientific African*, 8, e00432.
- Olayinka, O. O., Olu-Owolabi, B. I., & Adebowale, K. O. (2011). Effect of succinylation on the physicochemical, rheological, thermal and retrogradation properties of red and white sorghum starches. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 515-520.
- Oviedo Prieto R, Herrera Oliver P, Caluff MG, et al. , 2012. Lista nacional de plantas invasoras y potencialmente invasoras en la República de Cuba - 2011. (Lista nacional de especies de plantas invasoras y potencialmente invasoras en la República de Cuba - 2011). Bissea: Boletín sobre Conservación de Plantas del Jardín Botánico Nacional de Cuba, 6 (Número especial 1): 22-96.
- Pérez Mendoza, C., Hernández Livera, A., González Cossio, F. V., García de los Santos, G., Carballo Carballo, A., Vásquez Rojas, T. R., & Tovar Gómez, M. D. R. (2006). Tamaño de semilla y relación con su calidad fisiológica en variedades de maíz para forraje. *Agricultura técnica en México*, 32(3), 341-352.

- PIER, 2014. Ecosistemas de las islas del Pacífico en riesgo. Honolulu, EE.UU .: HEAR, Universidad de Hawaii. <http://www.hear.org/pier/index.html>.
- Porras Martínez, C. (2015, julio). Seminario El valor estratégico de las semillas en la agricultura. Calidad de semilla. Carolina Porras Martínez - PDF Descargar libre [Diapositivas]. <https://docplayer.es/>. <https://docplayer.es/76051467-Seminario-el-valor-estrategico-de-las-semillas-en-la-agricultura-calidad-de-semilla-carolina-porras-martinez.html>
- Poucell, C. A. F. (2010). Análisis proximal y factores tóxicos naturales del frijol Comba (*Phaseolus lunatus*) y Peruano (*Ph. Vulgaris*) crudos y cocidos; así como evaluación nutritiva de los frijoles cocidos, consumidos en San Miguel Totolapan, Gro. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rocha, O.J. & A.G. Stephenson. 1995. Regulation of flower, fruit, and seed production: *Phaseolus coccineus* a study case, pp. 245-262. In P.C. Hoch & A.G. Stephenson (eds.). Experimental and molecular approaches to plant biosystematics. Monograph in Systematic Botany from the Missouri Botanical Gardens. Vol 53
- Rojas, C.S. 2010. Malezas de Mexico. Recuperado 10 de Diciembre del 2021 a partir de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolus-lunatus/fichas/ficha.htm>
- Roskov, Y., Bisby, F., Zarucchi, J., & Novoselova, M. (2014). World Database of Legumes. In O. Bánki, Y. Roskov, L. Vandepitte, R. E. DeWalt, D. Remsen, P. Schalk, T. Orrell, M. Keping, J. Miller, R. Aalbu, R. Adlard, E. Adriaenssens, C. Aedo, E. Aescht, N. Akkari, M. A. Alonso-Zarazaga, B. Alvarez, F. Alvarez, G. Anderson, et al., Catalogue of Life Checklist (12, May 2014). <https://doi.org/10.48580/d4sl-382>
- Sakai, S., A. Sakai. 1996. Why is there variation in mean seed among plants within single populations? Test of the fertilization efficiency hypothesis. *Amer. J. Bot.* 83: 1454-1457
- Salazar G. A. (2014). Análisis Bromatológico. disponible en: <http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Documento/JatrophaContrataciones/ANALISISBROMATOLOGICO.pdf> (fecha de consulta 05 de febrero de 2022).

Sirajuddin, M., Ali, S., & Badshah, A. (2013). Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124(0), 1-19. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013>

Statistica 10. <http://www.statsoft.com/Portals/0/support/Download/TRIAL12.exe>

Stewart, G.R. & J.A. Lee. (1974). The role of proline acumulation in halophytes. *PLANTA*. 120: 279-289

Storey, R. y R.G. Wyn Jones. 1975. Betaine and choline levels in plants and their relationships to NaCl stress. *Planto Sci. Lett.* 4: 161- 168.

Vargas, Elida M, Castro, Emilio, Macaya, Gabriel, & J. Rocha, Oscar. (2003). Variación del tamaño de frutos y semillas en 38 poblaciones silvestres de *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) del Valle Central de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 51(3-4), 707-724.

Vásquez, F. M. F. F., & Fernández, H. Z. (2020). Análisis proximal en alimentos Fundamentos teóricos y técnicas experimentales. *Biblioteca Colloquium*

Ventura Gayete, J. F. (2007). Desarrollo de métodos analíticos medioambientalmente sostenibles por espectrometría FTIR.

Vilanova de la Torre, M. D. M., & Canosa Rodríguez, P. (2012). Los compuestos volátiles de la judía.

Wade, L.G. Jr. (1993) *Química Orgánica*, 2ª. Edición, México, Ed. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. de C.V.

Wielgolaski F., (2001). Phenological modifications in plants by various edaphic factors. *Int J Biometeorol* 45. 196-202. <https://doi.org/10.1007/s004840100100>

Yates R., Howieson G., Nandasena K., Hara G. 2004. Root-nodule bacteria from indigenous legumes in the north-west of Western Australia and their interaction with exotic legumes. *Soil Biology and Biochemistry*. Pag.18.