



UNIVERSIDAD DE MATANZAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE PASTOS Y FORRAJES
"Indio Hatuey"

**Tesis presentada en opción al título académico de Máster en
Pastos y Forrajes**

**Efecto de reguladores del crecimiento en la
germinación y el desarrollo de *Clitoria ternatea* L.
a partir de semillas conservadas**

Autora:

DMVZ. Yaldreisy Tania Galdo Rodríguez

Tutora:

M. Sc. Maribel Regla Quintana Sanz

Sancti Spíritus

2019

SÍNTESIS

El bajo porcentaje de germinación de los genotipos conservados por más de 20 años en banco de germoplasma de leguminosas (Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spíritus), con pérdidas de la viabilidad de las semillas definió la selección del material de partida. Los objetivos del trabajo fueron: evaluar diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en la estimulación de la germinación y evaluar el comportamiento morfoagronómico de las plántulas de *Clitoria ternatea* L. en condiciones controladas y en campo. Se calculó el porcentaje de germinación total (PGT) y su transformación angular, los días hasta el 50 % del PGT (G50) como medición inversa de la tasa de germinación, los días entre el 10 y 90 % del PGT (G10-90) considerado un estimado de extensión de la germinación. En fase de crecimiento en bandejas y en campo se evaluó la supervivencia y los caracteres agromorfológicos. El diseño experimental y los análisis estadísticos se adecuaron a los experimentos trazados. Las dosis de reguladores de crecimiento mostraron diferencias significativas respecto al control, potenciando la germinación de las semillas. Se logró una rápida tasa de crecimiento y no hubo diferencias en cuanto a la sincronía de la emergencia de la semilla. Se logró una eficiente adaptación de las plantas tratadas a condiciones controladas y a campo manteniendo un crecimiento estable con plantas vigorosas, sanas y sin presentar anomalías visibles fenotípicamente.

Palabras claves: *Clitoria ternatea*, reguladores de crecimiento, germinación, emergencia

ÍNDICE

INTRODUCCION	1
CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
I.1.- Origen, distribución, características botánicas, agronómicas y zootécnicas de <i>Clitoria ternatea</i> L.	4
I.2.- Conservación de semillas ortodoxas en bancos de germoplasma	11
I.2.1.- Mantenimiento de la viabilidad	12
I.2.2.- Mantenimiento de la integridad genética	13
I.2.3.- Mantenimiento de la sanidad de las semillas	15
I.3.- Fisiología de las semillas de las leguminosas forrajeras	16
I.3.1.- Dormancia	17
I.3.2.- Vigor y germinación	19
I.3.3.- Longevidad	20
I.4.- Tratamientos para estimular la germinación	21
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	26
II.1.- Material vegetal	26
II.2.- Efecto de reguladores de crecimiento en la germinación de semillas conservadas de <i>Clitoria ternatea</i> L.	26
II.3.- Evaluación del comportamiento morfoagronómico de plántulas de <i>Clitoria ternatea</i> L. en condiciones semi-controladas	28
II.4.- Evaluación del comportamiento agronómico de las plantas de <i>Clitoria ternatea</i> L. en campo	30
II.5.- Procesamiento estadístico	32
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
III.1.- Efecto de reguladores de crecimiento en la germinación de semillas conservadas de <i>Clitoria ternatea</i> L.	33
III.2.- Evaluación del comportamiento morfoagronómico de plántulas de <i>Clitoria ternatea</i> L. en condiciones semi-controladas	44
III.3.- Evaluación del comportamiento agronómico de las plantas de <i>Clitoria ternatea</i> L. en campo	50
CONCLUSIONES	58
RECOMENDACIONES	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

INTRODUCCION

En Cuba la alimentación de la masa ganadera se basa fundamentalmente en el uso de los pastos y forrajes debido a sus bondades nutricionales y por contar con un clima que lo permite (Lezcano, 2010); en el país se han realizado prospecciones a las áreas ganaderas colectándose alrededor de 28 géneros con más de 720 accesiones. El banco de germoplasma de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spíritus es el encargado de la custodia de estas especies para su evaluación, reproducción y conservación.

Las semillas de la mayoría de las especies leguminosas tienen comportamiento ortodoxo por su tolerancia al almacenamiento a largo y mediano plazo, lo cual facilita su conservación (Weitbrecht *et al.*, 2011). No obstante, mantener la viabilidad de las semillas conservadas en el tiempo se convierte en una de las tareas más engorrosas para la mayoría de los bancos de semillas del mundo (Gómez-Campo, 2006a).

Los reguladores del crecimiento, según Tsatsakis y Schitilman (1993), son sustancias endógenas insustituibles para las plantas, pues en su interrelación deciden el crecimiento y las bases para su ulterior desarrollo. En leguminosas Ellis *et al.* (1995) describen el uso de diversas concentraciones de auxinas y giberelinas acorde a género y especie, para favorecer el potencial fisiológico en la germinación de semillas conservadas en bancos de germoplasma.

Las auxinas juegan un destacado papel en casi todos los procesos relacionados con el desarrollo de las plantas, incluyendo la germinación de las semillas

(Hopkins y Hüner, 2009; Stepanova *et al.*, 2011). También se reconoce su importancia para la elongación y división celular, así como en la formación del embrión y su desarrollo (Del Pozo *et al.*, 2005).

Capote *et al.* (2012) han reportado incrementos en los porcentajes de germinación de diversos cultivos de importancia económica ante la aplicación de ácido giberélico (AG₃). Este resultado se corrobora por Asrar (2012) al demostrar que la aplicación exógena de AG₃ facilita el comienzo de la germinación en semillas de *Fagus sylvatica* L.

Nelson *et al.* (2009) resumen que, a pesar de décadas de investigación, la dormancia de la semilla sigue siendo un estado fisiológico complejo no entendido bien en la actualidad, el cual necesita de recursos como la luz, temperatura, nutrientes y hormonas vegetales, destacando el AG₃ por su implicación en el inicio y realización de la germinación. Reconocen que la proporción de ácido abscísico (ABA) y giberelinas (AG), en lugar de las cantidades absolutas de éstas hormonas, parece ser crítico en este proceso. Así, para liberar la semilla de la dormancia e iniciar la germinación, debe ocurrir una alteración en la biosíntesis y degradación en hormonas que lleve a una baja proporción ABA/AG que permita una disminución en la sensibilidad de ABA y un aumento en la sensibilidad de AG que aumente el potencial de crecimiento del embrión y debilite la cubierta de la semilla para que la radícula de la plántula pueda penetrarla con mayor facilidad (Guangwu y Xuwen, 2014).

Las pérdidas en la viabilidad de los genotipos conservados en el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes (IIPF)

observada al aplicar los métodos convencionales establecidos por las reglas internacionales para la evaluación de semillas (ISTA, 1993) motivó el estudio de algunos factores que pudieran incrementar el potencial fisiológico de dichas especies, y recuperar así la utilidad de las mismas. Por presentar severas pérdidas en el porcentaje de germinación, siendo las más tardías dentro de la colección conservada por 20 años, el Departamento de Recursos Fitogenéticos del centro recomendó la conchita azul (*Clitoria ternatea* SC-136) para su estudio.

HIPOTESIS DE TRABAJO

El empleo de reguladores de crecimiento como tratamientos pregerminativos en semillas conservadas de *Clitoria ternatea* L., incrementan la germinación y mejoran el crecimiento inicial de las plántulas de esta especie forrajera.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la efectividad del empleo de reguladores del crecimiento como tratamientos pregerminativos en semillas conservadas de *Clitoria ternatea* L.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Evaluar el efecto de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en la estimulación de la fase de germinación de semillas conservadas de *Clitoria ternatea* L.
- Evaluar el comportamiento morfoagronómico de las plántulas de *Clitoria ternatea* L. en condiciones semi-controladas y en campo.

CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1.- Origen, distribución, características botánicas, agronómicas y zootécnicas de *Clitoria ternatea* L.

El género *Clitoria* incluye 60 especies distribuidas en su mayoría dentro de la zona intertropical y muy pocas en zona templada (Kumar *et al.*, 2010). En su mayoría son nativas del Neotrópico con cuatro de África, seis del sudeste asiático y una de Australia. En Las Antillas se incluyen ocho especies, no endémicas, comprendidas en tres subgéneros, según Fantz (1990):

- Subgénero *Bractearia*:

C. arborescens (R. Brown).

C. dendrina (Pitt.).

C. fairchildiana Howard.

C. javitensis (H.B.K.) Benth.

- Subgénero *Clitoria*:

C. ternatea L.

- Subgénero *Neurocarpum*:

C. falcata Lam.

C. guianensis.

C. laurifolia Poir.

Dentro del subgénero *Clitoria* en Las Antillas aparecen cuatro endémicos y un nativo ampliamente extendido en el paleotrópico, uno de ellos es una enredadera comúnmente cultivada y naturalizada (Fantz, 1990).

La especie *Clitoria ternatea* L. (Greuter y Rankin, 2017) cuyos nombres comunes son campanilla (Panamá), papito (Salvador), bejuco de conchitas o conchita azul (Puerto Rico Cuba y México), zapatico de reina (Venezuela), clitoria (Colombia), campanita morada, entre otros (Medel, 2008), es originaria de América Tropical (Skerman, 1991) y también se menciona como centro de origen Asia Tropical (Al-Snafi, 2016). Villanueva *et al.* (2004) la localiza en ambos hemisferios de la tierra, desde los 20° N hasta los 24° S, donde se puede encontrar naturalmente o en forma cultivada (Medel, 2008).

Esta leguminosa prospera bien desde el nivel del mar hasta los 1 600 m de altitud o inclusive hasta los 1 800 msnm. Requiere precipitaciones desde 400 mm, con un mejor desempeño en áreas con 1 500 mm anuales. Se adaptada a diferentes condiciones de suelo, desde arenosos hasta aluviales, limosos profundos y arcillosos. También puede tolerar la salinidad, cultivándose en suelos de pH alto, dando buenos resultados en suelos pobres y mejores en suelos arcillosos, además es tolerante a la sequía. Esta especie es una de las más productivas y persistentes en el trópico. Por ejemplo, en Australia en un suelo arcilloso arenoso persistió por cuatro años. Sin embargo, presenta un crecimiento lento y una baja persistencia en suelos infértiles, pero se desarrolla exitosamente en suelos arcillosos y fértiles. En México la *C. ternatea* se adapta muy bien en suelos de buena fertilidad, profundos y húmedos (Medel, 2008). Las experiencias en Cuba demuestran que la conchita azul se desarrolla en áreas ganaderas, siendo reconocida por su alto valor nutricional (Ramos *et al.*, 2008).

Clitoria ternatea L. es una planta trepadora perenne, herbácea ligeramente leñosa en la parte baja, con tallos delgados y pubescentes, voluble hasta una altura de 5 m o más; si no encuentra en qué apoyarse, postrada, hojas imparipinnadas con 5-7 folíolos de elípticos a muy lanceolados de 1-5 cm de largo y 1-3 cm de ancho, poco pubescentes, de color verde intenso en el haz y verde más claro por el envés, peciolo de 1-4 cm de largo. Flores axilares, pedúnculos, 1 flor, de 1 a 3 cm de largo, brácteas ovoides–orbiculares, obtusas, de 5 a 7 mm de largo. Cáliz tubular, 5 dentado, de como 1,7 cm de largo, los lóbulos lanceolados, acuminados, los 2 superiores más o menos unidos. Corola grande, azul o blanca, a veces doble, el estandarte de 3 a 4 cm de largo, erecto, retuso, estrechado en la base; alas oblongas, encorvadas; quillas agudas, más corta que las alas. Estambres más o menos monadelfos; anteras todas semejantes. Ovario estipitado; estilo alargado, encorvado, peludo a lo largo de la cara interna. Vaina casi senil, plana, lineal, 2 valva, terminada en pico, pubescente, de 13 cm de largo o menos y 1 cm de ancho, con 7-10 semillas por vaina. Semillas comprimidas, subreniformes, moteadas, de 5 a 6 mm de largo (Fantz, 1990; Al-Snafi, 2016; Deshmukh y Desai, 2017).

Es una planta autónoma con un número de cromosomas de $2n=16$ cromosomas y se plantea que fertilidad del polen oscila entre 93-97%, es de día corto, con un ciclo de 120-180 días y la maduración de la semilla es escalonada lo que dificulta la mecanización de la cosecha (Skerman *et al.*, 1991).

Esta planta es relativamente específica en cuanto a sus necesidades de rizobios, y es atacada por nematodos, saltamontes y crisomélidos; en condiciones de

humedad es afectada por *Rhizoctonia microsclerotia*, *Corticium solani* y virosis como el mosaico dorado (Skerman *et al.*, 1991; Duangkhet, 2018).

En evaluaciones sobre los efectos de la altura y los intervalos de corte, se verificó que la producción de materia seca se incrementa con la longitud del intervalo de corte, hasta un máximo de 56 días, siendo la combinación de este intervalo con una altura de corte de 5-10 cm, la de mejor resultado; por otro lado, al evaluar la variación estacional de los contenidos de nutrientes y el valor nutritivo de plantas forrajeras entre ellas *C. ternatea*, ésta mostró el mejor y más estable contenido de nutrientes por planta, dentro de las leguminosas evaluadas, además tuvo una producción de MS aceptable (2 309 kg) según Enrique *et al.* (1995).

Se considera muy útil como abono verde (Castro *et al.*, 2018), cultivo intercalado y como cobertura en cultivos perennes y se asocia bien con gramíneas altas y estoloníferas de los géneros: *Sorghum*, *Megathyrsus*, *Cenchrus*, *Cynodon*, *Digitaria* y *Brachiaria*; además por su hábito de crecimiento puede ser utilizada en los sistemas silvopastoriles. Bajo condiciones de riego es posible obtener con *Clitoria* rendimientos anuales superiores a 20 t/ha de materia seca (MS) y bajo pastoreo es capaz de persistir y soportar cargas de 4-6 cab/ha en asociación con gramíneas (Córdova *et al.*, 1987; Enrique *et al.*, 1995; Binder, 1997).

Produce hasta 24 toneladas de forraje fresco por hectárea. En asociación con pasto guinea (*Megathyrsus maximus*), o con pasto jaragua (*Hyparrhenia rufa*) produjo hasta 18 toneladas de forraje seco por hectárea por año (Villanueva *et al.*, 2004). El contenido de proteína en la materia seca varía de 24 - 30 % (Suárez *et al.*, 2012). Otros autores reportan un contenido de proteína bruta de 19,25 %

(Murillo *et al.*, 2015), 43 % para las semillas, y una digestibilidad de la materia seca de 74,2 % y no causa toxicidad. También García *et al.* (2015) al comparar el rendimiento y valor nutritivo de varias leguminosas forrajeras registró las mayores concentraciones de proteína en *Clitoria ternatea* con valores cercanos a 200 g/kg de MS a partir de los 42 días de rebrote en ambas épocas del año. De ahí que puede ser consumida por borregos, cabras y bovinos. Puede utilizarse para el pastoreo directo, corte en verde para hacer heno, como abono verde y para ensilaje con gramíneas (Medel, 2008).

Rojas *et al.* (2005) al evaluar la producción de materia seca del pasto Elefante (*Cenchrus purpureus*) solo y asociado con *Clitoria ternatea* obtiene los mayores rendimientos de materia seca con intervalo de corte de 70 días (22,3 t/ha) y en la asociación (22,4 t/ha).

Para la *Clitoria ternatea* se recomienda la utilización de un sistema de pastoreo rotacional con tiempo controlado (<2 h/día), respetando los tiempos de ocupación y descanso requeridos por el cultivo, con periodos de ocupación no mayores de siete días y periodos de descanso que varían de 40 a 60 días, según la época del año (García, 2014). En cultivos y asociaciones establecidas, el inicio del pastoreo es posible el mismo año con carga animal baja. Asociada, el exceso de una u otra especie deberá controlarse con el mismo pastoreo, utilizando cargas variables, manteniendo un balance entre las especies utilizadas, garantizando así la productividad y persistencia de la pradera (Garza *et al.*, 1972).

Por otro lado, Medel (2008) mencionó que en asociación con gramíneas estoloníferas como zacate pangola (*Digitaria decumbens*) y bajo pastoreo es

capaz de persistir y soportar de cuatro a seis cabezas de ganado bovino por hectárea, sin embargo, recomienda tres cabezas por hectárea para menor riesgo de la leguminosa.

Villanueva (2000) refiere en relación con la producción de carne bovina ganancias diarias de peso por animal de 402 g en vaquillas europeas bajo condiciones de pastoreo en monocultivos de *Clitoria*, y también se observó después de 363 días de pastoreo una ganancia diaria promedio de peso vivo por animal de 944 y 920 g en praderas asociadas de Pangola/*Clitoria*, utilizadas bajo dos sistemas de pastoreo. Por otra parte, se reportan ganancias promedio de 717 g diarios por animal cuando se evalúa el comportamiento productivo de bovinos bajo condiciones de pastoreo en una asociación similar de Pangola/*Clitoria*, con tres cargas animal y diferentes días de pastoreo y descanso.

Al comparar la utilización de heno de *Clitoria* y alfalfa en la alimentación de becerros lactantes alimentados *ad libitum* desde la primera semana de edad (Villanueva, 2000) no encontró diferencias en las ganancias de peso por animal, las cuales fueron de 743 y 803 g/día, observándose una eficiencia alimenticia de 550 y 650 g/kg de alimento consumido para los henos de *Clitoria* y alfalfa, respectivamente.

La producción de carne ovina con la utilización de *Clitoria ternatea* fue similar para los animales mantenidos en pradera, respecto a los estabulados con suplementos a base de *Clitoria* (23% PC) y una mezcla de gallinaza y pulidura de arroz (16% PC, 200 g/animal/día). Así, las ganancias de peso por animal, fluctuaron de 152 a 160 gramos cuando se utilizó total o parcialmente la alimentación con *Clitoria*; sin

embargo, los tratamientos a base de Clitoria fueron más rentables que aquellos que incluían el suplemento basado en gallinaza y pulidura de arroz (Villanueva, 2000).

Al comparar el suministro de heno de alfalfa y de clitoria a vacas Suizo Pardo, Villanueva *et al.* (2004) no encontraron diferencias en la producción de leche (10,5 vs 10,1 L/día), pudiéndose incluir hasta un 50 % en el suplemento sin detrimento en la producción láctea para reducir el 30 % los costos de alimentación. En sustitución de gramíneas hay incrementos de 1,6 a 3,0 kg/animal/día de la producción de leche sin efectos en su calidad.

En su composición química, posee contenidos de proteína bruta que oscilan entre 17,6-22 %, destacándose por sus altos porcentajes de aminoácidos esenciales como: arginina (4,4%), leucina (7,4%), glicina (4,1%), lisina (6,1%), similares o superiores en algunos casos a otras leguminosas importantes como la soya, leucaena y alfalfa; los niveles de ácidos grasos saturados e insaturados son comparables con los que poseen el maní, la palma de aceite y el ajonjolí, ya que contiene 50 % de ácido oléico, 16% de ácido palmítico y 9% de ácido esteárico; presenta bajos niveles de factores antinutricionales y tóxicos (glicósidos cianogénicos, polifenoles, fitatos y actividad inhibidora de la tripsina), comparada con otras leguminosas como *Canavalia ensiformis*, *C. gladiata* y *Phaseolus lunatus* (Laurena *et al.*, 1994; Lucas y Souto, 1997; Al-Snafi, 2016).

No obstante, a partir de semillas de esta especie, se aislaron proteínas con probada acción antifúngica y bactericida (Gollen *et al.*, 2018), que pudieran encontrar amplia aplicación en la transformación genética de plantas, para

incrementar su resistencia a las enfermedades producidas por hongos y bacterias. Se estableció la estructura y función de un carotenoide presente en las raíces de *C. macrophylla* y *C. fairchildiana* (6-deoxiclitoriactal 11-O-beta-D-glucopiranosido) y se comprobó su acción citotóxica *in vitro*, contra una línea celular de leucemia (Lin *et al.*, 1992; DaSilva *et al.*,1998); finalmente, se purificaron y caracterizaron parcialmente inhibidores de tripsina de 20, 12 y 7 Kda a partir de semillas de *C. ternatea* y se detectó que sus sitios activos son de lisina y arginina (Macedo *et al.*,1992; Lata Zingare *et al.*, 2013).

I.2.- Conservación de semillas ortodoxas en bancos de germoplasma

La conservación de germoplasma vegetal como actividad científica fue propuesta en los años 70 del siglo XX con el objetivo de prevenir la erosión genética y mejorar la productividad agrícola de muchas especies a partir de la conservación de diferentes especies y genes de interés. Existen dos estrategias básicas para la conservación de germoplasma vegetal, la conservación *in situ* y la conservación *ex situ* (Nodarse *et al.*, 1998).

En la conservación *in situ* las especies se mantienen en su hábitat natural, generalmente en parques nacionales, reservas biológicas y reservas ecológicas. Mientras que, en la conservación *ex situ* las especies se preservan fuera de su hábitat natural, en bancos de semillas botánicas, bancos de plantas en campo o en bancos de plantas *in vitro* (Reed *et al.*, 2004; García, 2007).

La conservación *ex situ* busca mantener el germoplasma fuera de sus ambientes originales, ya sea en forma de plantas enteras (jardines botánicos) o en bancos de

genes, semillas, tubérculos o propágulos (bancos de germoplasma) según Baena *et al.* (2003) y Franco (2008).

Para fines de conservación las semillas se clasifican en ortodoxas y recalcitrantes. Las primeras conservan su viabilidad después de deshidratarse, pudiendo reducirse su contenido de humedad y germinar sin problemas después de rehidratarse; por lo mismo constituyen el material idóneo para almacenamiento de largo plazo en bancos de conservación. Por el contrario, las semillas recalcitrantes no toleran una deshidratación significativa respecto al contenido de humedad presente en el momento de la diseminación (generalmente entre el 30 y 50), de modo que no pueden ser objeto de conservación como tales en bancos de semillas (Gutiérrez y Koch, 2015; Reveles y Velásquez, 2017).

Al conservar las semillas ortodoxas en bancos de germoplasma puede utilizarse el secado a niveles de humedad del 6 %, y la congelación a -20 °C (Berjak y Pammenter, 2013). Esta forma de conservación, si bien no es perfecta, es eficiente en extender la longevidad de las semillas a períodos que pueden superar los 50 años, lo cual reduce los riesgos de contaminación y pérdida de la diversidad genética de las poblaciones conservadas, y los costos asociados a multiplicar periódicamente un número importante de unidades de conservación. Estas unidades de conservación son llamadas “accesiones” y están normalmente conformadas por muestras mayores a 1 500 semillas (Condón y Rossi, 2018).

I.2.1.- Mantenimiento de la viabilidad

La mayoría de las plantas forrajeras, tanto gramíneas como leguminosas producen semillas ortodoxas, capaces de almacenarse por largos períodos de tiempo sin

perder la viabilidad, bajo las condiciones adecuadas, en bancos de germoplasma. Las colecciones base usualmente conservan semillas desecadas (4 a 7 %) en recipientes herméticos a temperaturas bajas (-18 a -20 °C) y las colecciones activas utilizan temperaturas entre -5 y +5 °C con una humedad relativa de ± 35 % (Engels y Visser, 2003; Gómez-Campo, 2007).

A pesar de conservarse las semillas en condiciones adecuadas existen procedimientos de rutina en los bancos de germoplasma para controlar la viabilidad de las accesiones, no existiendo una norma general para todas las especies ya que tienen distintas exigencias de luz, medios y temperatura (Gómez-Campo, 2006b). Así, la regeneración o multiplicación se realiza cuando la viabilidad de un lote se encuentra por debajo de un nivel aceptable; este nivel es, frecuentemente, del 85%; o cuando el peso o el número total de semillas de una accesión es menor que la cantidad mínima permitida (FAO, 2014). El orden de prioridad seguido para regenerar las accesiones es el siguiente: las que tienen baja viabilidad, las que se necesitan con urgencia para suministro o uso en el banco de germoplasma y las que tienen un bajo número de semillas, pero una alta viabilidad (Painting *et al.*, 1993).

I.2.2.- Mantenimiento de la integridad genética

Un banco de germoplasma es un repositorio de semillas, tejidos o plantas que tiene por objetivo preservar la diversidad genética. Por este motivo es que se lo considera un tipo de banco, ya que estas semillas y sus genes son conservados como un recurso a ser utilizado con fines de investigación, incluyendo el mejoramiento genético (Reveles y Velázquez, 2017).

La diversidad genética comprende la variación hereditaria tanto dentro como entre poblaciones de una especie o grupo de especies. Esta variación es lo que permite a las especies adaptarse, se encuentra en el ADN, y puede dar mejores (o peores) características adaptativas a las siguientes generaciones. Los bancos de germoplasma intentan compendiar esta diversidad; así el germoplasma, es el conjunto de genes que se transmite por la reproducción a la descendencia por medio de gametos o células reproductoras (Reveles y Velázquez, 2017).

Para las especies de semillas ortodoxas, los bancos de germoplasma constituyen el método más práctico para preservar grandes cantidades de material genético en un pequeño espacio. En los últimos tiempos se plantea posible la conservación por siglos o incluso un milenio. Paradójicamente, al conservarse es posible la aparición de erosión genética interna, que comienza desde el proceso de selección, seguido de los test de germinación, distribución, regeneración, etc. Estas operaciones pueden parecer normales y necesarias, pero a la vez pueden provocar pérdidas de materiales cuando se conducen sin la suficiente atención o detalle, o sin analizar las pérdidas económicas. De este modo, los métodos de preservación no adecuados pueden llegar a ser la causa principal de pérdidas masivas de material valioso, y así de erosión genética (Gómez-Campo, 2006a; Pullin *et al.*, 2013).

Por lo anterior, contribuir a la preservación de la diversidad genética de las especies nativas y naturalizadas (principalmente de uso forrajero), cuyas poblaciones se pueden considerar en riesgo por el impacto de la intensificación

agrícola y/o el cambio climático es una tarea prioritaria para los gobiernos (Condón y Rossi, 2018).

I.2.3.- Mantenimiento de la sanidad de las semillas

Los bancos de germoplasma deben esforzarse por garantizar que las semillas que conservan y distribuyen están libres de enfermedades transmitidas por semillas y plagas reglamentadas (bacterias, virus, hongos e insectos). Normalmente las superficies externas pueden eliminarse de forma eficaz mediante procedimientos de desinfección superficial. A menudo, los bancos de germoplasma carecen de la capacidad y los recursos necesarios para estudiar si las muestras recolectadas o adquiridas y las muestras recolectadas en las parcelas de regeneración/ multiplicación están libres de enfermedades transmitidas por semillas y plagas. Esto ocurre de forma especial con el germoplasma recibido de terceros (FAO, 2014). La limpieza de algunas muestras infectadas o infestadas puede ser fácil, mientras que otras pueden requerir de métodos de limpieza más sofisticados (Dulloo *et al.*, 2008).

Los procedimientos para mantener un germoplasma saludable son importantes en cualquier colección para poder proveer de plantas saludables a las diferentes solicitudes que se le realicen al banco de germoplasma. Las mayores dificultades se presentan generalmente para conseguir los antisueros necesarios en técnicas de detección de virus específicos. Los curadores deben ser los encargados de considerar el estado de salud y la susceptibilidad de los materiales vegetales cuando deciden el modo de conservarlos (Reed *et al.*, 2004).

Los requisitos para mantener el germoplasma sano han sido descritos en numerosas publicaciones que detallan la identificación de patógenos (Diekmann y Putter 1996; Frison y Taher, 1991; Dueñas *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2009; Thomas, 2015). La certificación fitosanitaria también es un factor fundamental para el intercambio de germoplasma entre instituciones (Reed *et al.*, 2004).

I.3.- Fisiología de las semillas de las leguminosas forrajeras

Las semillas de las leguminosas forrajeras, pueden secarse y almacenarse a bajas temperaturas y bajos contenidos de humedad, según los patrones convencionales para las semillas ortodoxas; estos dos factores son determinantes para el éxito en su conservación. Una disminución simultánea de ambos factores permite, teóricamente, mantener durante cientos de años la viabilidad de sus semillas (Reino, 2005).

Estas semillas pueden sobrevivir y persistir por largos períodos de tiempo, ya sea almacenadas o en el suelo, por su cubierta dura e impermeable (Boschi *et al.*, 2016), permitiendo conservar la viabilidad y mantener el mismo tamaño y aspecto al finalizar el análisis de germinación en el laboratorio (ISTA, 2012).

Los procesos fisiológicos de crecimiento exigen actividades metabólicas aceleradas y la fase inicial de la germinación consiste primariamente en la activación de los procesos por aumentos en la humedad y actividad respiratoria de la semilla (Doria, 2010).

Atendiendo a la longevidad de las semillas, es decir, el tiempo que éstas permanecen viables, puede haber semillas que germinan todavía después de

decenas o centenas de años, con una cubierta seminal dura, como es el caso de las leguminosas. Una semilla será más longeva cuando menos activo sea su metabolismo. Esto a su vez origina una serie de productos tóxicos, que al acumularse en las semillas produce efectos letales para el embrión. Las bajas temperaturas dan lugar a un metabolismo mucho más lento, por lo que las semillas conservadas en esas condiciones viven más tiempo que a temperatura ambiente (Alzugaray *et al.*, 2007).

Según Velázquez, 2014 la calidad fisiológica de la semilla abarca la suma de todas las propiedades o características, las cuales determinan el nivel potencial del comportamiento de las semillas y el establecimiento del cultivo. Los componentes de la calidad de la semilla incluyen los aspectos genéticos, físicos, fisiológicos y sanitarios (microorganismos e insectos).

I.3.1.- Dormancia

Uno de los principales problemas para establecer cultivos es la latencia de semillas, que en condiciones naturales asegura la supervivencia de las especies en situaciones desfavorables (Sanabria *et al.*, 2001). Baskin y Baskin (2004) clasifican a la dormancia en: fisiológica, regulada por la temperatura; morfológica, se presenta por el subdesarrollo del embrión; morfofisiológica, cuando existe efecto de los dos tipos de dormancia anteriormente citadas; física, presente cuando existen capas impermeables al agua; y combinada, cuando una semilla presenta todos los tipos de latencia citados (Abril-Saltos *et al.*, 2017). La latencia física también es denominada como interna o endógena, puede generarse por la

semipermeabilidad de la cubierta de la semilla, conocida como imbibición tegumentaria, y participan en su regulación el ácido abscísico y las giberelinas (Herrera *et al.*, 2006). La latencia morfológica o embrionaria, en ocasiones se supera con exposición a enfriamiento en húmedo (Abril-Saltos *et al.*, 2017), donde las semillas pueden germinar en un rango más estrecho de condiciones ambientales; sin embargo, al eliminarse permite la germinación en un rango más amplio de condiciones (Herrera *et al.*, 2006).

En los bancos de germoplasma, la dormancia interfiere con los procedimientos normales de regeneración y monitoreo de la germinación. Varias de las especies almacenadas presentan un elevado grado de dormancia (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2014). Este comportamiento dificulta su regeneración y como consecuencia, su conservación (Wünschová *et al.*, 2009).

Para interrumpir la dormancia se emplean diferentes tratamientos con resultados diversos. La exposición a diferentes concentraciones de Giberlinas (GAs) por diferentes intervalos de tiempo (Bewley y Black, 1994), la incubación de semillas a bajas temperaturas (comúnmente de 5 a 10 °C) en condiciones de humedad para simular un periodo de hibernación (Yamauchi *et al.*, 2004), la exposición a diferentes fuentes de nitrógeno (Bethke *et al.*, 2007; Oracz *et al.*, 2009), la inmersión de semillas en nitrógeno líquido (-196 °C) por determinados periodos (Chen *et al.*, 2009) y la escarificación con ácido sulfúrico (H₂SO₄) (Finkelstein *et al.*, 2008) han sido procedimientos satisfactorios para promover la germinación en diferentes especies.

I.3.2.- Vigor y germinación

El vigor de un lote de semillas, se define como el conjunto de propiedades que determinan el nivel de actividad y capacidad de las semillas durante la germinación, y posterior emergencia de las plántulas. Las semillas con buen comportamiento se consideran semillas de alto vigor. Cuando una semilla es viable, y no presenta dormancia, germinará cuando se le coloque en las condiciones adecuadas de humedad, luz y temperatura. Por lo tanto, se acepta que la capacidad germinativa de un lote de semillas es un reflejo directo de su viabilidad (Reveles y Velázquez, 2017).

Las pruebas de germinación y de viabilidad han sido utilizadas ampliamente en la evaluación de la calidad de las semillas, cabe destacar que la calidad fisiológica hace referencia a mecanismos intrínsecos de la semilla que determinan su capacidad de germinación, la emergencia y el desarrollo de aquellas estructuras esenciales para producir una plántula normal bajo condiciones favorables (Jaramillo y Baena, 2000; Cruz, 2017).

Según Reveles y Velázquez (2017) la emergencia de la radícula es el criterio que se suele utilizar para determinar si una semilla ha germinado, expresándose los resultados obtenidos como porcentaje de semillas germinadas (porcentaje de viabilidad). Por otra parte, Celis *et al.* (2008) cuantifican el vigor de la plántula como el peso o tamaño de las plantas jóvenes que aún dependen de las reservas del endospermo (etapa heterótrofa). Luego, al ser consumidas las reservas del endospermo, las plántulas dependen de su capacidad para generar asimilados, formar un dosel y superar a las arvenses.

La emergencia es dependiente de la calidad de la semilla y del ambiente de cultivo (humedad del suelo, patógenos, temperatura e impedancia, como los más importantes). Unas semanas después de la emergencia, las diferencias morfológicas entre las plántulas permitirán conocer el denominado vigor temprano (Revilla *et al.* 1999).

I.3.3.- Longevidad

El tiempo que tardan las semillas en perder su viabilidad (longevidad) es variable, de acuerdo a la especie y dependiendo de factores tanto externos (temperatura ambiental), como internos de las semillas (contenido en humedad, genotipo, etc.), no obstante, la longevidad media de la mayoría de las especies se puede situar entre 5 y 25 años (Pérez y Pita, 2001).

Dada la importancia de todos estos aspectos en el ámbito de la fisiología y tecnología de semillas, se han desarrollado diferentes protocolos para evaluar la viabilidad y vigor de las semillas, así como para lograr condiciones de almacenamiento que aseguren una mayor longevidad (Jaramillo y Baena, 2000).

Por ello las principales colecciones de semillas son de especies con semillas ortodoxas, que en teoría pueden alcanzar longevidades muy elevadas, debido al efecto combinado de las bajas temperaturas y de la desecación, y según las Reglas de Harrington podrían mantenerse viables durante más de diez mil años (Pérez y Pita, 2001).

I.4.- Tratamientos para estimular la germinación

Un camino fisiológico conocido para mejorar el comportamiento germinativo de muchas especies de interés agrícola son los tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación de las semillas, que ha probado ser eficiente para revigorizar semillas envejecidas, acelerar e incrementar la germinación y los rendimientos de las plantas, tanto bajo condiciones ecológicas óptimas como adversas (Bradford, 1986; Sánchez, *et al.*, 2001).

Los métodos de hidratación parcial de las semillas han sido agrupados en dos categorías, en dependencia de si el suministro de agua a éstas es controlado o no. Otros métodos de hidratación se fundamentan en el uso de soluciones osmóticas que permiten la hidratación de las semillas en función del equilibrio de potenciales hídricos que se establecen en el sistema solución-semilla, el cual mantiene un nivel de humedad deseado y desencadena mecanismos bioquímico-fisiológicos relacionados con la germinación. Esta metodología ha sido aplicada con éxito en un gran número de cultivos como hortalizas, leguminosas y cereales (Reino, 2005).

El uso de tratamientos para romper la latencia tegumentaria permite que las semillas presenten buena respuesta en tiempo y porcentaje de germinación, remojándolas durante veinticuatro horas a temperatura ambiente, lo cual podría deberse a una imbibición más rápida que la que se obtendría en el semillero humedecido (Abril-Saltos *et al.*, 2017).

Para mejorar el intercambio de oxígeno y humedad entre el embrión y el medio ambiente, es necesario debilitar la cubierta tegumentaria, para ello se pueden

aplicar tratamientos mecánicos como: incisiones en la cubierta de la semilla, tratamientos con calor o debilitamiento de la cubierta con el uso de papel lija o arena gruesa (Oliveira *et al.*, 2007).

La escarificación con tratamientos químicos también es común, las sustancias más utilizadas son los ácidos sulfúricos y clorhídricos concentrados. Este mecanismo genera un proceso de aireación exotérmica, por lo cual es necesario dejarlas que se enfríen antes de aplicar otros tratamientos (Abril-Saltos *et al.*, 2017).

Otra de las herramientas actuales para mejorar la germinación de las semillas y los parámetros fisiológicos relacionados, optimizar la capacidad de absorción, degradación de reservas y división celular es la aplicación de las nanotecnologías. El efecto de las nanopartículas (NPs) comienza a manifestarse desde la germinación de las semillas, reflejándose en una mayor emergencia y uniformidad, que se constata en la germinación final. Esto se debe principalmente a la penetración de nanomateriales en la semilla, para permitir un aumento de la imbibición de agua y micronutrientes, que aceleran la degradación de reservas y benefician a las primeras etapas del proceso germinativo (Cruz, 2017).

Para estimular la regeneración de semillas conservadas en bancos de germoplasma también se han probado diversas sustancias químicas, y dentro de ellas los reguladores de crecimiento por su importante rol durante el crecimiento y desarrollo de las plantas (Taiz y Zeiger, 2006; Mayo-Mosqueda *et al.*, 2017). En leguminosas Ellis *et al.* (1995) describieron el uso de diversas concentraciones de auxinas y giberelinas de acuerdo con el género y especie, para favorecer el

potencial fisiológico en la germinación de semillas conservadas en bancos de germoplasma (Quintana *et al.*, 2013).

Las auxinas juegan un destacado papel en casi todos los aspectos relacionados con el desarrollo de las plantas, incluyendo la germinación de las semillas. También se reconoce su importancia para la elongación y división celular, así como en la formación del embrión y su desarrollo (Hopkins y Hüner, 2009).

Por otra parte, el incremento de la germinación en semillas de varios cultivos de importancia económica ante la aplicación de ácido giberélico (AG₃) ha sido expuesto por Capote *et al.* (2012). Este resultado se corroboró por Asrar (2012) al demostrar que la aplicación exógena de AG₃ facilita la ruptura de la dormancia y el comienzo de la germinación en semillas de *Fagus sylvatica* L.

Otros autores coinciden en que el ácido giberélico puede ser utilizado como un desinhibidor de la germinación y así, reemplazar la necesidad de estímulos ambientales, como luz y temperatura (Saldívar-Iglesias *et al.*, 2010). Algunas investigaciones han demostrado el efecto del ácido giberélico en la germinación de semillas de *Ferocactus* sp. (Amador *et al.*, 2013), *Ischaemum rugosum* Salisb (Jarma *et al.*, 2007), *Nothofagus alessandri*, *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus pumilio* (Rocuant, 1984), donde las giberelinas influyeron en la activación del crecimiento vegetativo del embrión, el debilitamiento de la capa del endospermo y la movilización de reservas almacenadas en este (Taíz y Zeiger, 2006).

Carranza *et al.* (2016) reconocen a las hormonas de las plantas incluyendo ABA, etileno, auxinas, citoquininas, giberélinas y brasinoesteroides como sustancias químicas que controlan muchos procesos fisiológicos y bioquímicos, los cuales

pueden afectar diferentes actividades incluyendo la latencia y germinación de las semillas.

Los parámetros más importantes que controlan el proceso de latencia en semillas, son cambios a nivel molecular, que incluyen alteraciones de proteínas y hormonales, ej. el balance entre ABA y giberélinas (Graeber *et al.*, 2012). Así, la latencia de las semillas está bajo la influencia de las hormonas de las plantas, y de las características morfológicas y estructurales de la semilla, tal como, el endospermo, pericarpio del fruto y propiedades de la cubierta seminal. El balance giberélinas/ABA determina la habilidad de las semillas para germinar o las vías necesarias para la germinación. El nitrógeno puede inhibir la latencia en la semilla al disminuir los niveles de ABA, el etileno estimula la germinación de semillas y supera la latencia en varias especies. Puede interactuar con la luz y las giberelinas para promover la germinación de semillas de alfalfa (Carranza *et al.*, 2016).

Por otro lado, se ha encontrado que las auxinas presentes en la punta de la radícula de las semillas durante y después de la germinación, estimulan un rápido crecimiento de las plántulas (Hentrich *et al.*, 2013). Las auxinas acumuladas en los cotiledones de semillas, son la mayor fuente de auxina durante el crecimiento de las plántulas (Miransari y Smith, 2014). Aunque las auxinas por sí solas no son importantes para la germinación de semillas, su interacción y cruce con las giberelinas y el etileno puede influenciar los procesos de germinación de semillas y establecimiento (Carranza *et al.*, 2016).

Las citoquininas (benciladenina, zeatina, kinetina, tidiazuron) son hormonas de crecimiento que regulan un amplio rango de comportamientos en la planta,

incluyendo la germinación de las semillas. Pueden mejorar la germinación y ayudan a aliviar el estrés generado por la salinidad, la sequía, los metales pesados y el estrés oxidativo (Carranza *et al.*, 2016).

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spiritus perteneciente al Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, del Ministerio de la Agricultura de Cuba. El centro se localiza en los 21°55'25" de latitud norte y los 79°21'25" de longitud oeste, en el punto de confluencia de la Carretera Central y el Río Tuinucú, asentándose sobre una de sus márgenes; a una altitud sobre el nivel del mar de 40 m, y suelos distribuidos sobre pendientes del 2 % exposición sur.

II.1.- Material vegetal

Se emplearon semillas conservadas por 20 años de la leguminosa forrajera denominada conchita azul (*Clitoria ternatea* L. accesión SC-136) de flores blancas, procedentes del banco de germoplasma del IIPF. Las condiciones de conservación fueron el estándar de acuerdo con lo descrito para el almacenamiento de semillas ortodoxas en el Manual sobre tecnología de semilla para bancos de germoplasma (Ellis *et al.*, 1985; Álvarez, 2014).

II.2.- Efecto de reguladores de crecimiento en la germinación de semillas conservadas de *Clitoria ternatea* L.

Las semillas fueron lavadas con agua y detergente comercial, seguido de reiterados enjuagues en agua corriente hasta eliminar los restos del detergente. En la desinfección se utilizó etanol 70% (1 minuto) con una gota de Triton X-100. Posteriormente, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 %

de cloro activo durante 10 minutos y finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

En todos los casos se colocaron 25 semillas por placa Petri (9 cm) sobre papel de filtro (Double Rings) saturado (4 ml) en agua destilada estéril (control) y diferentes soluciones de los reguladores del crecimiento (KIN: 6- furfuril amino purina, BAP: 6- bencil amino purina y AG₃: ácido giberélico) en concentraciones de 0,5 y 1 mg/l aplicadas solas o combinadas con ANA: ácido naftalen acético (0,1 mg/l).

El diseño fue completamente aleatorizado con cuatro replicas. La temperatura de incubación osciló en 27 ± 2 °C y se realizaron evaluaciones diarias hasta los 21 días.

En los ensayos se consideraron como germinadas las semillas con elongación de hipocótilo y emergencia de radícula que demostraron capacidad para desarrollarse de manera sostenida en condiciones adecuadas, y como plántulas normales aquellas con estructuras esenciales (raíces, brotes y suficiente reserva de alimento), capaces de desarrollarse en plantas reproductivamente maduras según Rao *et al.* (2007).

Las variables medidas fueron el porcentaje total de germinación (PTG) por la ecuación $PTG = (\text{número de semillas germinadas} / \text{número de semillas totales}) \times 100$ (Sánchez y Ramírez, 2006). Se calcularon los días hasta el 50 % del PTG y los días entre el 10 y 90 % del PTG (Murray *et al.*, 1993). El período hasta el 50 % del PTG (G_{50}) como una medición inversa de la tasa de germinación, mientras que el período entre 10 y 90 % del PTG (G_{10-90}) se consideró como un estimado de la

extensión de la germinación, lo inverso a la sincronía de germinación (Tiryaki *et al.*, 2006).

A los 21 días se evaluaron además, las variables porcentaje de plantas normales, altura de las plántulas (cm), masa fresca (mg), longitud del hipocótilo (cm), longitud de la radícula (cm) y la relación LH/ LR.

II.3.- Evaluación del comportamiento morfoagronómico de plántulas de *Clitoria ternatea* L. en condiciones semi-controladas

Las plántulas germinadas a los 21 días se desarrollaron bajo condiciones semicontroladas con una iluminación reducida al 70 % mediante una malla plástica (zarán). La irrigación fue manual con frecuencia de 3 riegos diarios en las dos primeras semanas y 2 riegos en las restantes, este régimen se manejó de acuerdo al comportamiento de las lluvias.



Figura 1. Llenado de las bandejas experimentales con el sustrato empleado.

Las plántulas fueron sembradas en bandejas de poliespuma (Figura 1) con 120 orificios de capacidad 22 cm³ y dimensiones de 66,0 cm de longitud, 35,0 cm de ancho y 5,2 cm de altura. En los orificios se depositó el sustrato compuesto por una mezcla de suelo Pardo mullido (Hernández *et al.*, 2015) y humus de lombriz en proporción 7:3 y el llenado de los mismos fue de forma manual.

Se tomó muestra de la mezcla del sustrato de las bandejas para ser analizada en el laboratorio de la Estación Experimental de Suelos Barajagua, atendiendo a los siguientes elementos:

- pH. (CI K). Método potenciométrico. Norma: 22-1000.
- P₂O₅ y K₂O (meq/100g). Método Oniani y Machiguin (Colorimetría). Norma: 52-1999.
- Materia Orgánica (%). Método Walkley-Black, 1980 (Colorimetría). Norma: 65-2000.
- Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, T (meq/100g). Método Complexométrico. Norma: 65-2000.
- Na⁺, K⁺ (meq/100g). Método fotometría de llama. Norma: 65-2000.

VARIABLES A MEDIR: con una frecuencia de 10 días durante un mes se evaluó el porcentaje de supervivencia y el porcentaje de plantas normales; se determinó además, la altura de las plántulas (cm) y la presencia de hojas verdaderas. A los 30 días se contó la cantidad de hojas por planta.

El diseño del experimento fue completamente aleatorizado con cuatro replicas.

II.4.- Evaluación del comportamiento agronómico de las plantas de *Clitoria ternatea* L. en campo

La preparación de suelo se efectuó de forma tradicional: rotura, grada, cruce, grada, recuce y grada con un intervalo entre cada una de las labores de 15-20 días, se combinaron las labores de tracción animal con mecanizada.



Figura 2. Extracción del cepellón de *C. ternatea* SC-136 para el pase a campo.



Figura 3. Muestra de la bandeja con las plantas previo a la plantación en campo.

Las plantas con cepellones (Figura 2) procedentes de las bandejas (Figura 3) fueron trasplantadas en campo a surco corrido con un marco de 0,60 x 0,30 m,

depositadas a una profundidad de 1,5 a 2,0 cm, cubriéndolas ligeramente. Se ubicaron siguiendo el mismo orden de los tratamientos probados en la inducción de la germinación, o sea, identificando cada tratamiento en el campo (1 al 11) para su seguimiento evaluativo. El diseño experimental aplicado fue de distribución en serie sencilla (Rosselló y Fernández, 1986).

El tipo de suelo empleado fue Pardo mullido (Hernández *et al.*, 2015), y se le tomó muestras para su análisis agroquímico en el laboratorio de la Estación Experimental de Suelos Barajagua, atendiendo a los siguientes elementos:

- pH. (CI K). Método potenciométrico. Norma: 22 – 2000.
- P₂O₅ y K₂O (meq/100g). Método Oniani y Machiguin (Colorimetría). Norma: 52 – 1999.
- Materia Orgánica (%). Método Walkley-Black, 1980 (Colorimetría). Norma: 65 – 2000.
- Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ (meq/100g). Método Complexométrico. Norma: 65 – 2000.
- Na⁺, K⁺ (meq/100g). Método fotometría de llama. Norma: 65 – 2000.

Los datos climáticos históricos y del período experimental se tomaron de la estación meteorológica ubicada en el municipio de Sancti Spíritus, con la característica de ser la más cercana al área donde se realizó el estudio, los mismos fueron reportados por el Centro Meteorológico Provincial (Sancti Spíritus).

Los elementos climáticos estudiados fueron:

- Temperatura promedio (°C),
- Temperatura máxima (°C),
- Temperatura mínima (°C),

- Humedad relativa (%),
- Lluvias (mm),
- No. días con lluvia.

Las mediciones realizadas a los 30 y 60 días fueron:

1. Supervivencia (0=no vivo, 1=vivo).
2. Fenología (1=estado vegetativo, 2=inicio floración, 3=floración plena, 4=vaina verde, 5=vaina madura, 6=vaina seca estado de cosecha).
3. Longitud del tallo rastrero (cm).
4. Altura hasta la yema apical (cm).
5. Planta normal (0=muerto, 1=normal, 2=anormal).

II.5.- Procesamiento estadístico

Las variables con valores porcentuales se les aplicó una transformación angular por $X' = 2 \arcsen \sqrt{P}$, donde P fue la proporción. En el caso de las variables de conteo de dígitos pequeños se transformaron por $X' = \sqrt{x}$ y por $X' = \sqrt{0,5 + x}$ cuando aparecieron valores cero (Ruesga *et al.*, 2005).

Una vez comprobados los supuestos para la aplicación de pruebas paramétricas se evaluaron los datos a través de un análisis de varianza de clasificación simple y las diferencias fueron detectadas mediante la Prueba de rangos múltiples de Duncan (1955). Todos los procesamientos se hicieron utilizando el paquete estadístico SPSS/PC para Windows versión 15.0.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1.- Efecto de reguladores de crecimiento en la germinación de semillas conservadas de *Clitoria ternatea* L.

Al someter las semillas a la desinfección se pudo observar un total control de agentes contaminantes durante las pruebas de germinación, lo cual permitió evaluar los experimentos planificados con un 100 % de efectividad del método de desinfección. Resultados similares fueron obtenidos por Quintana *et al.* (2014) en la multiplicación *in vitro* de varias leguminosas forrajeras y pueden deberse a que la superficie lisa de la semilla de *C. ternatea* SC-136 facilita su desinfección.

Las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento influyeron en los resultados del porcentaje total de germinación (PTG) de las semillas conservadas en el Banco de germoplasma al presentar diferencias altamente significativas respecto al control (Tabla 1), el cual fue superado del 10 al 25 % en todos los casos. Esto corrobora que haya sido abordado por muchos autores el uso de promotores del crecimiento celular, naturales y sintéticos, quedando bien documentado el importante papel de éstos en diversos caracteres relacionados con el crecimiento de las plantas (Asrar, 2012).

Los mejores porcentajes de germinación (33 %) fueron observados al aplicar 1 mg/L de BAP sólo o combinado con ANA (Tabla 1), lo cual puede deberse al efecto de las citoquininas en la germinación de semillas considerado independiente de su rol en la morfogénesis de los brotes. Estudios recientes muestran que las citoquininas han demostrado un efecto metabólicamente activo

en todas las fases de la germinación desde la emergencia de la radícula hasta el inicio del establecimiento de la plántula (Chiwocha *et al.*, 2005; Stirk *et al.*, 2005; Nikolić *et al.*, 2006).

Tabla 1. Comportamiento de la germinación de semillas conservadas de *Clitoria ternatea* L. ante diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento.

Tratamientos	Porcentaje total de germinación (PTG)	
	%	X'
Control	8	0,1434 ^b
0,5 mg/l KIN	27	0,3748 ^a
1 mg/l KIN	22	0,3347 ^a
0,5 mg/l KIN + 0,1 mg/l ANA	28	0,3826 ^a
0,5 mg/l BAP	26	0,3663 ^a
1 mg/l BAP	33	0,4172 ^a
1 mg/l BAP + 0,1 mg/l ANA	33	0,4143 ^a
0,5 mg/l AG ₃	32	0,4003 ^a
1 mg/l AG ₃	27	0,3756 ^a
1 mg/l AG ₃ + 0,1 mg/l ANA	30	0,3925 ^a
0,1 mg/l ANA	18	0,3006 ^a

^{ab} Valores con letras no comunes por columna difieren a $P \leq 0,01$ (Duncan, 1955).

La adición de BAP y ANA ha estimulado la germinación de semillas de la Orquidia terrestre (*Calanthe tricarinata*), siendo el BAP más efectivo que el ANA (Godo *et al.*, 2010). También el empleo de la KIN y BAP ha permitido la germinación de semillas *Pinus peuce* en el rango de 72-80 % (Stojičić *et al.*, 2012).

Guangwu y Xuwen (2014) demuestran que aplicaciones exógenas de AG₃ y auxina incrementaron la germinación de semillas de pino al promover la respiración, bajar el nivel de ácido abscísico (ABA) y estimular la síntesis de auxinas y giberelinas.

En la Tabla 2 se observa la más rápida tasa de germinación ($G_{50}=2,0$ d) para el tratamiento tradicional (control), lo cual puede estar relacionado con el bajo porcentaje de germinación total (8%) del propio tratamiento. A pesar de no existir diferencias estadísticas entre las variantes estudiadas cuando se prueban las combinaciones de reguladores de crecimiento existe tendencia a duplicarse la tasa de germinación respecto al control llegando a alcanzar 5 a 6 días cuando se utiliza la giberelina o la auxina sola. Reducción en la tasa de germinación ha sido reportada para semillas dormantes de *Amaranthus cruentus* L. con el empleo de reguladores de crecimiento (Tiryaki *et al.*, 2005).

La sincronía en la emergencia de las semillas (G_{10-90}) se hace menor (Tabla 2) para los tratamientos de más bajo porcentaje de germinación (control, 8 % y 0,1 mg/l ANA, 18 %), se corroboró que la mayor duración del período germinativo se debe al efecto de la acción de las citoquinas, que alcanza su máxima expresión ($G_{10-90}=8,25$ d) cuando se empleó la kinetina (0,5 mg/l KIN) combinada con ANA. Las citoquininas descubiertas en la búsqueda de factores que promueven la división celular de plantas en cultivo, han demostrado que influyen en numerosos aspectos del desarrollo y fisiología de las plantas, incluyendo la germinación de las semillas (Haberer y Kieber, 2002).

Tabla 2. Días hasta el 50 % del PTG (G₅₀) y entre 10 y 90 % de germinación (G₁₀₋₉₀) de la semilla de *C. ternatea* ante diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal.

Tratamientos	G ₅₀	G ₁₀₋₉₀
	(días)	(días)
Control	2,00	0,50
0,5 mg/l KIN	3,75	7,00
1 mg/l KIN	4,75	6,00
0,5 mg/l KIN + 0,1 mg/l ANA	4,75	8,25
0,5 mg/l BAP	4,50	4,25
1 mg/l BAP	4,75	7,75
1 mg/l BAP + 0,1 mg/l ANA	4,25	5,50
0,5 mg/l AG ₃	6,00	3,25
1 mg/l AG ₃	5,00	5,50
1 mg/l AG ₃ + 0,1 mg/l ANA	6,50	4,00
0,1 mg/l ANA	5,25	2,00
Nivel de significación	NS	NS

Estudios de Tiryaki *et al.* (2006) han reportado el uso de reguladores de crecimiento como tratamiento pregerminativo para mejorar la tasa y la sincronía de germinación en otros pastos. Por otra parte, Patil *et al.* (2012) refieren que el efecto promotor de las citoquininas en la germinación de semillas esta

principalmente relacionado con su actividad en la disminución de los factores de estrés.

La altura de las plantas (Figura 4) alcanzó su mayor elongación (5,6 cm) para la combinación de AG₃ (1 mg/l) y ANA (0,1 mg/l), sin diferencias estadísticas con los tratamientos KIN (1 mg/l), BAP (1 mg/l solo o combinado con ANA) y AG₃ (0,5 mg/l), así como la auxina sola. Similares resultados muestran Akbari *et al.* (2007) al emplear auxina en la germinación de semillas de trigo para obtener incremento del largo del hipocótilo y de la masa fresca, pero no aumento el porcentaje de germinación y el largo de la radícula.

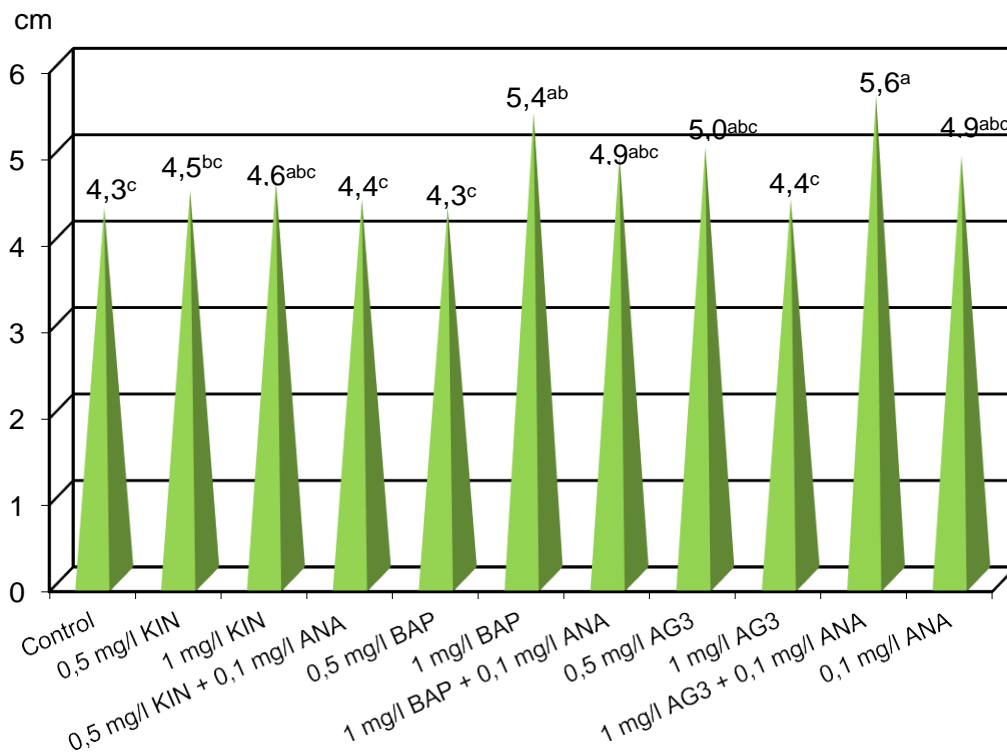


Figura 4. Altura de las plántulas de *C. ternatea* ante la utilización de diferentes reguladores del crecimiento. (Letras iguales no difieren significativamente entre sí $P \leq 0,05$).

En este sentido Patil *et al.* (2012) encontraron incrementos en la longitud de los brotes procedentes de las plántulas germinadas de semillas de *Digitalis purpurea* al emplear citoquininas (BA, KIN y TDZ), siendo significativamente superiores al compararlo con el tratamiento control.

En la Figura 5 puede observarse la medición de la masa fresca de las plántulas germinadas de semillas bajo la influencia de diferentes dosis y reguladores de crecimiento y su resultados (Figura 6) indican diferencias significativas entre los tratamientos donde se destaca la aplicación de 1 mg/l de BAP (320 mg de masa fresca), estos resultados coinciden en varias de las variables evaluadas incluyendo el porcentaje total de germinación, lo que demuestra el efecto beneficioso de este regulador de crecimiento como promotor del crecimiento y desarrollo del genotipo evaluado.



Figura 5. Evaluación de la masa fresca (mg) a los 21 días posteriores a la siembra de *C. ternatea* SC-136.

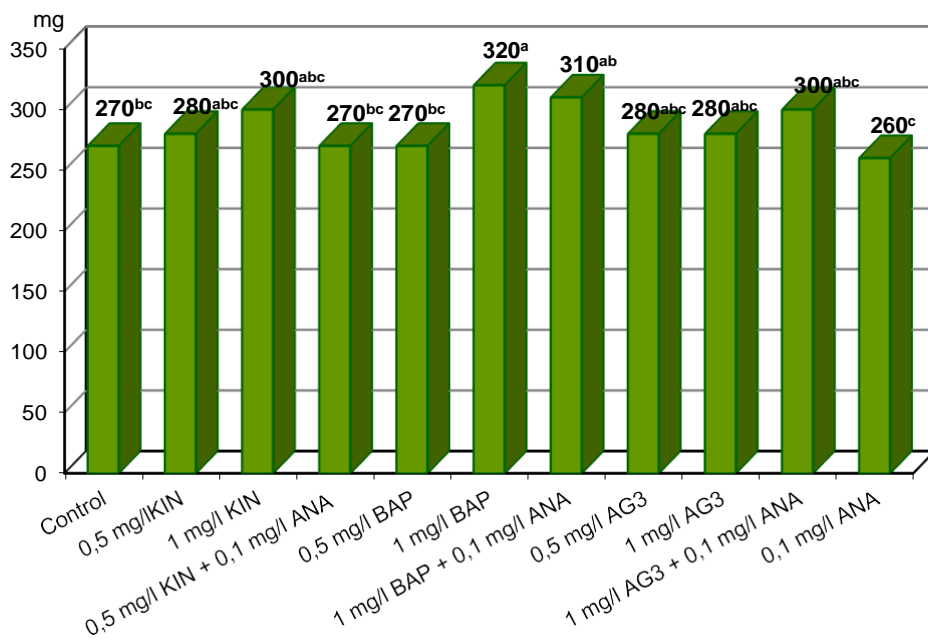


Figura 6. Masa fresca de las plántulas de semillas conservadas de *Clitoria ternatea* SC-136 con la utilización de diferentes reguladores del crecimiento. (Letras iguales no difieren significativamente entre sí $P \leq 0,05$).

En la literatura se reporta que las aplicaciones exógenas de citoquininas tienen variados efectos en la germinación de semillas de especies vegetales (Nikolić *et al.*, 2006). Dentro de los tipos y concentraciones de citoquininas, el BAP ha mostrado los mejores resultados en la germinación de semillas, seguido por la KIN, siendo siempre superiores a los resultados del control (Patil *et al.*, 2012).

La longitud del hipocótilo respondió ante los reguladores de crecimiento probados (Tabla 3, Figura 7) con diferencias estadísticas ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos. No se encontró un patrón diferencial específico para las dosis hormonales evaluadas, aunque el mayor valor alcanzado fue para la combinación de AG₃ (1 mg/l) y ANA (0,1 mg/l).

Tabla 3. Resultados obtenidos en la longitud del hipocótilo con la utilización de diferentes reguladores del crecimiento.

Tratamientos	Longitud del hipocótilo (cm)
Control	3,32 ^c
0,5 mg/l KIN	3,68 ^{abc}
1 mg/l KIN	3,67 ^{abc}
0,5 mg/l KIN + 0,1 mg/l ANA	3,37 ^c
0,5 mg/l BAP	3,25 ^c
1 mg/l BAP	4,26 ^{ab}
1 mg/l BAP + 0,1 mg/l ANA	3,85 ^{abc}
0,5 mg/l AG ₃	3,79 ^{abc}
1 mg/l AG ₃	3,39 ^{bc}
1 mg/l AG ₃ + 0,1 mg/l ANA	4,36 ^a
0,1 mg/l ANA	3,86 ^{abc}

^{abc} Valores con letras no comunes por columna difieren a $P \leq 0,05$ (Duncan, 1955).



Figura 7. Medición realizada a los 21 días de la longitud del hipocótilo (cm).

A las giberelinas se les reconoce gran influencia en muchos procesos relacionados con el desarrollo de la planta, dentro de ellos cumple un importante papel en el estímulo en la elongación del tallo y en la interrupción del período de latencia de las semillas por la movilización de las reservas del endospermo (Taiz y Zeiger, 2006; Asrar, 2012) procesos que se verifican en los resultados experimentales obtenidos. Weitbrecht *et al.* (2011) afirman que las giberelinas son los reguladores del crecimiento que juegan el rol principal en la regulación de una rápida germinación en semillas.

Akbari *et al.* (2007) al emplear auxinas en la germinación de semillas de trigo pudieron obtener incrementos en la longitud del hipocótilo y en la masa fresca, aunque no en el porcentaje de germinación y la longitud de la radícula. Por otra parte, Vijay y Kumar (2004) plantean que la combinación de ANA y AG₃ favorece el incremento de peso en las plántulas de *A. acemosus* por encima del control, debido a que la interacción entre las hormonas endógenas y exógenas juegan un rol importante en el crecimiento de las plántulas.

La longitud de la radícula ante los diferentes tratamientos hormonales (Tabla 4) mostró diferencias significativas en los resultados. Los valores mayores se alcanzaron en aquellos tratamientos que no mostraron los índices más elevados de germinación, en cambio para PTG mayores se obtuvieron menores elongaciones. Destaca que la acción de la kinetina sola o combinada con la auxina, independientemente de la dosis usada alcanzó sobrepasar los 2 cm de longitud de la radícula.

Tabla 4. Resultados obtenidos en la longitud de la radícula con la utilización de diferentes reguladores del crecimiento.

Tratamientos	Longitud de la radícula (cm)
Control	1,99 ^{ab}
0,5 mg/l KIN	2,34 ^a
1 mg/l KIN	2,00 ^{ab}
0,5 mg/l KIN + 0,1 mg/l ANA	2,12 ^{ab}
0,5 mg/l BAP	1,51 ^c
1 mg/l BAP	1,14 ^d
1 mg/l BAP + 0,1 mg/l ANA	1,10 ^d
0,5 mg/l AG ₃	2,10 ^{ab}
1 mg/l AG ₃	1,93 ^{ab}
1 mg/l AG ₃ + 0,1 mg/l ANA	1,96 ^{ab}
0,1 mg/l ANA	1,81 ^{bc}

^{abcd} Valores con letras no comunes por columna difieren a $P \leq 0,05$ (Duncan, 1955).

Vijay y Kumar (2004) han reportado que el AIA favorece el máximo desarrollo de la raíz y los brotes de *Asparagus racemosus* con una concentración de 50 ppm.

Dhoran y Gudadhe (2012) al estudiar el efecto de reguladores de crecimiento en la germinación y el vigor de las plántulas obtenidas de semillas de *Asparagus sprengeri* Regelín encontraron que el AG₃ fue mejor en la inducción de germinación y desarrollo de las radículas que las auxinas probadas (AIA, AIB, ANA).

La relación LH/LR mostró valores altos en dos de los tratamientos evaluados, lo que indica una elongación del hipocótilo en las plántulas obtenidas debido a la aplicación de 1 mg/l de BAP, ya sea sólo o combinado con la auxina (ANA), resultados similares han sido encontrados por Capote *et al.* (2000; 2005).

Tabla 5. Resultados obtenidos en la relación LH/LR plántulas germinadas de *Clitoria ternatea* SC-136 con el empleo de reguladores de crecimiento vegetal.

Tratamientos	Relación LH/LR
Control	1,88 ^{bc}
0,5 mg/l KIN	1,71 ^{bc}
1 mg/l KIN	2,07 ^{bc}
0,5 mg/l KIN + 0,1 mg/l ANA	1,63 ^c
0,5 mg/l BAP	2,49 ^b
1 mg/l BAP	4,34 ^a
1 mg/l BAP + 0,1 mg/l ANA	3,73 ^a
0,5 mg/l AG ₃	1,91 ^{bc}
1 mg/l AG ₃	1,85 ^{bc}
1 mg/l AG ₃ + 0,1 mg/l ANA	2,39 ^{bc}
0,1 mg/l ANA	2,40 ^{bc}

^{abc} Valores con letras no comunes por columna difieren a $P \leq 0,05$ (Duncan, 1955).

La longitud de los brotes y radículas en las plántulas germinadas a partir de semillas de *Digitalis purpurea* L. presentó incrementos ante la presencia de las citoquininas probadas (BA, KIN y TDZ) según reportan Patil *et al.* (2012), siendo BA y KIN las que tuvieron máximos resultados para los parámetros de crecimiento

medidos (longitud del brote, longitud de la raíz, masa fresca y seca de la plántula). Valores inferiores se observaron al utilizar auxinas (AIA, ANA y 2,4-D); aunque todos los reguladores de crecimiento evaluados prevalecieron en comparación con el tratamiento control.

El porcentaje de plantas normales fue del 100 % en todos los casos y no se observaron diferencias fenotípicas en las plántulas que germinaron ante ninguna de las combinaciones de reguladores de crecimiento probados, siendo de gran importancia para la aplicación de tratamientos con sustancias estimuladoras de la germinación que puedan recomendarse para material vegetal conservado en banco de germoplasma por largos períodos de tiempo.

De manera resumida se puede plantear que la utilización de reguladores de crecimiento en el estímulo de la germinación de semillas de *C. ternatea* conservadas en banco de germoplasma es efectiva, mostrando valores superiores al control en todos los casos. Por otra parte, los parámetros fisiológicos medidos demuestran que el tratamiento con BAP (1 mg/l), sólo o combinado con la auxina (ANA), favorece las plántulas germinadas y se observa un mejor comportamiento en comparación con el resto de los tratamientos probados.

III.2.- Evaluación del comportamiento morfoagronómico de plántulas de *Clitoria ternatea* L. en condiciones semi-controladas

El resultado de la composición agroquímica del sustrato utilizado para la aclimatación de las vitroplantas se observa en la Tabla 6, el cual cumple con los requisitos necesarios para esta labor, con un pH neutro, un contenido de materia orgánica medio y adecuado contenido de nutrientes.

Tabla 6. Análisis agroquímico del sustrato empleado.

Muestra	pH	Valor de T	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	P ₂ O ₅	K ₂ O	M.O.
	(CIK)		(meq/100g)						(%)
Sustrato	6,42	21,18	15,80	6,10	0,67	1,60	10,2	19,51	4,41

Las plántulas procedentes de semillas germinadas bajo la influencia de reguladores de crecimiento para estimular la inactividad metabólica del período de latencia mantuvieron una supervivencia por encima del 85 % al ser plantadas en el sustrato en todos los casos (Tabla 7), sin mostrar diferencias significativas entre los tratamientos probados. Se observa, además, una tendencia a definir la supervivencia de las plántulas en los primeros 10 días de siembra, ya que exceptuando los tratamientos que incluyeron el AG₃ en dosis de 1 mg/l, todos los demás mantuvieron en buen estado fisiológico las plántulas hasta la siembra en campo de las mismas.

Das *et al.* (2017) indican que las semillas de *Clitoria ternatea* poseen dormancia fisiológica que puede romperse de manera efectiva al emplear tratamientos que incluyen variación en la humedad y temperatura. Al llevar a campo dichas semillas, una vez tratadas, procedentes de largos períodos de almacenamiento lograron incrementar el porcentaje de germinación y el índice de vigor medido por los autores. También Ramírez y Suárez plantean que las semillas de la leguminosa forrajera “zapatico de la reina” (*Clitoria ternatea* L.) posee una cubierta dura e impermeable que impide el paso del agua, inhibiendo en parte el proceso

de germinación, pero la posibilidad de romper la dormancia en dichas semillas se demuestra efectiva al lograr dicho autores porcentajes de emergencia de hasta 94 % al cuarto día al aplicar tratamientos pregerminativos.

Tabla 7. Porcentaje de supervivencia de plántulas crecidas en bandejas.

Tratamientos	10 días	20 días	30 días
Control	100	100	100
0,5 mg/l KIN	100	100	100
1 mg/l KIN	93	93	93
0,5 mg/l KIN + 0,1 mg/l ANA	95	95	95
0,5 mg/l BAP	86	86	86
1 mg/l BAP	100	100	100
1 mg/l BAP + 0,1 mg/l ANA	100	100	100
0,5 mg/l AG ₃	100	100	100
1 mg/l AG ₃	95	91	91
1 mg/l AG ₃ + 0,1 mg/l ANA	100	95	84
0,1 mg/l ANA	92	92	92

Al evaluar la altura de las plantas (Tabla 8, Figura 8) en las bandejas se observó sincronía en el crecimiento de las plántulas con vigor en todos los tratamientos, centrándose los mejores resultados en la aplicación de kinetina, bencilaminopurina (1 mg/l) y el ácido giberélico, cuando se emplearon en la dosis más bajas, sin que se observaran diferencias significativas respecto al tratamiento control. Los niveles más bajos en la variable altura se alcanzan cuando se aplica la auxina sola, la bencilaminopurina en dosis de 0,5 mg/l y el ácido giberélico (1 mg/l).

Tabla 8. Altura de las plántulas (cm) crecidas en bandejas.

Tratamientos	10 días	20 días	30 días
Control	7,80 ^a	10,88 ^a	12,90 ^a
0,5 mg/l KIN	6,06 ^b	9,48 ^{ab}	10,08 ^{abc}
1 mg/l KIN	5,74 ^b	8,64 ^{ab}	10,86 ^{abc}
0,5 mg/l KIN + 0,1 mg/l ANA	5,93 ^b	8,66 ^{ab}	12,09 ^{ab}
0,5 mg/l BAP	3,98 ^c	6,04 ^c	7,20 ^e
1 mg/l BAP	5,64 ^b	8,18 ^b	10,96 ^{abc}
1 mg/l BAP + 0,1 mg/l ANA	5,62 ^b	8,86 ^{ab}	10,67 ^{abc}
0,5 mg/l AG ₃	5,71 ^b	9,72 ^{ab}	12,03 ^{ab}
1 mg/l AG ₃	5,39 ^b	8,31 ^b	9,00 ^{cde}
1 mg/l AG ₃ + 0,1 mg/l ANA	5,49 ^b	8,37 ^b	8,74 ^{de}
0,1 mg/l ANA	5,03 ^{bc}	7,72 ^{bc}	9,46 ^{bcde}
ES±	0,29	0,20	0,26

^{abcde} Valores con letras no comunes por columna difieren a $P \leq 0,05$ (Duncan, 1955).

Lo anterior confirma el efecto estimulante de las citoquininas en el crecimiento de las plántulas como una sustancia estimuladora de la división celular (Krikorian, 1993), así como de las giberelinas capaces de intervenir en el crecimiento vegetal al ocasionar especialmente un alargamiento celular (Crozier, 1981; Mac Millan, 1984).



Figura 8. Plántulas de *C. ternatea* SC-136 al evaluar la altura (cm) en bandejas a los 10 días de sembradas.

La complejidad en los mecanismos fisiológicos que responden a la adición de diferentes reguladores de crecimiento es bien conocida, así como, las relaciones sinérgicas que pueden existir entre ellos. Por tanto, la diversidad de vías por las cuales los reguladores controlan las respuestas fisiológicas sugiere que pueden existir múltiples mecanismos de interacción (Coenen y Lomax, 1997).

La emergencia de hojas verdaderas (Tabla 9) se produjo antes de los 10 días posteriores a la siembra, independientemente del tratamiento de procedencia, y las plántulas que emitieron las hojas mantuvieron su vigor para permitir un buen crecimiento y desarrollo. No se observaron diferencias significativas entre las variantes probadas y cuando disminuyó (1 mg/l, AG₃) se debió a que pesar de emitir las hojas la plántula no logró sobrevivir.

Tabla 9. Porcentaje de emergencia de hojas verdaderas de las plántulas en bandeja.

Tratamientos	10 días	20 días	30 días
Control	100	100	100
0,5 mg/l KIN	100	100	100
1 mg/l KIN	93	93	93
0,5 mg/l KIN + 0,1 mg/l ANA	95	95	95
0,5 mg/l BAP	86	86	86
1 mg/l BAP	100	100	100
1 mg/l BAP + 0,1 mg/l ANA	100	100	100
0,5 mg/l AG ₃	100	100	100
1 mg/l AG ₃	95	91	91
1 mg/l AG ₃ + 0,1 mg/l ANA	100	95	84
0,1 mg/l ANA	92	92	92

La cantidad de hojas verdaderas emitidas por planta que se evaluó a los 30 días previo a su trasplante para condiciones de campo, no mostró diferencias estadísticas entre los tratamientos probados aunque fue ligeramente superior cuando se aplicó la KIN (1 mg/l), lo cual corrobora los resultados anteriores donde se pone de manifiesto el beneficio provocado por la aplicación de reguladores de crecimiento vegetal para estimular la germinación de semillas de *Clitoria ternatea* SC-136 y el crecimiento de las plántulas obtenidas, sin que se observen efectos adversos sobre las mismas.

Abril-Saltos *et al.* (2017) al aplicar diferentes tratamientos pregerminativos, dentro de los cuales están los reguladores de crecimiento, obtuvieron resultados satisfactorios tanto en la germinación como en la velocidad de crecimiento, con las mayores alturas de las plantas reportadas para el tratamiento que aplicó AG₃ en las especies *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, *Eugenia stipitata* McVaugh y *Piptocoma discolor* (Kunth) Pruski, evaluadas en bandejas durante un ensayo realizado bajo cubierta y expuesto a la libre circulación de aire.



Figura 9. Plántulas de *C. ternatea*SC-136 previa a su trasplante a condiciones de campo.

En este experimento de forma general se observó una adaptación eficiente de las plántulas al sustrato en las bandejas manteniendo un crecimiento estable que definió el trasplante a campo de plantas vigorosas, sanas y sin anomalías visibles fenotípicamente, como se observa en la Figura 9.

III.3.- Evaluación del comportamiento agronómico de las plantas de *Clitoria ternatea* L. en campo

Los datos climáticos del período evaluativo (Tabla 10) fueron favorables para el buen rendimiento del cultivo de forma general. Se destacan precipitaciones por

encima del promedio histórico en febrero (93,1 mm) y abril (58,1 mm), aunque el total de lluvias durante el experimento fue de 576,1 mm y estuvo por debajo (138,6 mm) del acumulado histórico para dicha etapa. La temperatura media fue de 23,4°C y la humedad relativa promedio de 77 % durante el período experimental.

Tabla 10. Comportamiento climático durante el período experimental (P.E.) y promedio histórico (P.H.).

Var./Meses		Temp.Prom. (°C)	Temp. Max. (°C)	Temp. Mín. (°C)	Hum. Rel. (%)	Lluvias (mm)	No. días con Lluvia
Sept.	P.E.	26,1	32,1	22,3	85	174,2	19
	P.H.	25,7	31,5	22,1	87	230,8	19
Oct.	P.E.	25,8	31,0	22,1	82	76,2	12
	P.H.	24,9	30,2	21,3	86	194,0	15
Nov.	P.E.	23,7	29,1	19,4	79	18,9	6
	P.H.	23,6	28,8	19,8	85	62,3	9
Dic.	P.E.	23,8	29,6	19,1	78	16,2	4
	P.H.	22,0	27,7	17,8	83	34,5	6
Ene.	P.E.	20,6	26,6	15,9	73	7,4	11
	P.H.	21,3	27,3	16,6	81	35,6	5
Feb.	P.E.	21	26,9	15,9	74	137,7	13
	P.H.	21,9	28,4	16,7	78	44,6	4
Mar.	P.E.	21,8	27,4	16,7	73	29,6	8
	P.H.	23,0	29,5	17,6	76	55,1	6
Abr.	P.E.	24,5	30,0	20,1	75	115,9	13
	P.H.	24,3	31,0	19,0	75	57,8	7

Las características agroquímicas del suelo Pardo mullido empleado para el experimento en fase de campo pueden observarse en la Tabla 11, es importante destacar que este tipo de suelo es uno de los predominantes en las áreas destinadas a la ganadería en Cuba.

Tabla 11. Análisis agroquímico del suelo Pardo mullido.

Muestra	pH	Valor de T	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	P ₂ O ₅	K ₂ O	M.O.
	(CIK)		(meq/100g)					(%)	
Suelo exp.	5,66	15,44	13,04	3,12	0,26	0,35	6,51	13,77	2,61

Para la especie en estudio las condiciones del suelo fueron adecuadas ya que es un cultivo de gran plasticidad capaz de adaptarse desde suelos arenosos hasta arcillosos pesados, con moderada fertilidad. Se adapta a rangos de pH de 5,5-8,9 aunque prefiere suelos alcalinos. Es capaz de subsistir en regiones lluviosas y prolongados períodos de sequía y se le reconoce tolerancia a la salinidad (Gómez y Kalamani, 2003).

La adaptación a campo de las plántulas procedentes de bandejas fue exitosa al mantener índices de supervivencia elevados sin diferencias significativas respecto a los tratamientos de inducción de germinación probados (Tabla 12), donde sólo cuatro variantes estuvieron por debajo del 100 % de adaptación al suelo.

Diferentes trabajos corroboran la influencia de los reguladores del crecimiento en el estímulo del desarrollo fisiológico en plantas con resultados de mejor vigor, rapidez en la elongación celular, y como consecuencia su adaptación al ambiente

y supervivencia, tanto en bandejas bajo condiciones de invernadero como en campo (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2014; Abril-Saltos *et al.*, 2017; Mero *et al.*, 2017).

Tabla 12. Porcentaje de supervivencia (%) de las plantas en campo.

Tratamientos	30 días	X'	60 días	X'
Control	100	0,7853	100	0,7853
0,5 mg/l KIN	91	0,7139	91	0,7139
1 mg/l KIN	100	0,7853	100	0,7853
0,5 mg/l KIN + 0,1 mg/l ANA	100	0,7853	84	0,6613
0,5 mg/l BAP	100	0,7853	100	0,7853
1 mg/l BAP	100	0,7853	100	0,7853
1 mg/l BAP + 0,1 mg/l ANA	88	0,6929	76	0,6005
0,5 mg/l AG ₃	82	0,6467	65	0,5081
1 mg/l AG ₃	92	0,7249	69	0,5437
1 mg/l AG ₃ + 0,1 mg/l ANA	100	0,7853	75	0,5890
0,1 mg/l ANA	100	0,7853	92	0,7249
Total	95	0,7446	84	0,6632
Nivel de signif.		NS		NS

Carranza *et al.* (2016) al evaluar el efecto de la aplicación exógena de reguladores de crecimiento (ácido giberélico, ácido indolbutírico, zeatina) sobre la germinación de semillas de badea (*Passiflora quadrangularis* L.) en bandejas de germinación con sustrato de turbia rubia, bajo condiciones de invernadero, logró porcentajes de germinación de 54,5 % al aplicar ácido giberélico, disminuyó el tiempo medio de germinación con 29,4 días y aumentó la velocidad de germinación de la semilla de

badea con 6,55 semillas/día. Estos resultados contribuyeron a mejorar la eficiencia de los procesos de reproducción sexual desarrollados por los viveristas que propagan la especie en Colombia.

Tabla 13. Altura hasta la yema apical (cm) de las plantas en campo.

Tratamientos	30 días	60 días
Control	27,77	31,00 ^{ab}
0,5 mg/l KIN	25,30	28,06 ^b
1 mg/l KIN	24,59	28,18 ^b
0,5 mg/l KIN + 0,1 mg/l ANA	21,89	24,89 ^b
0,5 mg/l BAP	23,00	30,17 ^{ab}
1 mg/l BAP	28,00	39,18 ^a
1 mg/l BAP + 0,1 mg/l ANA	27,93	34,07 ^{ab}
0,5 mg/l AG ₃	27,00	31,50 ^{ab}
1 mg/l AG ₃	25,17	27,67 ^b
1 mg/l AG ₃ + 0,1 mg/l ANA	24,57	25,57 ^b
0,1 mg/l ANA	28,92	31,07 ^{ab}
Error típico	0,68875	0,83554

^{abc} Valores con letras no comunes por columna difieren $P \leq 0,05$ (Duncan, 1955).

Cuando se determinó la altura de la planta hasta la yema apical (Tabla 13) en la primera evaluación (30 días), se observó un comportamiento homogéneo en la población, pues no se muestran diferencias significativas en las plantas procedentes de los tratamientos probados. A los 60 días en campo las plantas se

mantienen respecto a su altura sin diferencias estadísticas al comparar el control y las tratadas con BAP, la auxina sola o el giberélico (0,5 mg/l), por lo que se puede sugerir que la incidencia de los promotores del crecimiento actúa en la ruptura de la dormancia y una vez desarrollada la plántula mantiene su fisiología normal.

Ramírez y Suárez (2014) al evaluar diferentes tratamientos pregerminativos en dos genotipos de *C. ternatea* cultivados en bandejas en el Vivero Universitario, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, Venezuela observaron en ambos genotipos que la altura de la planta y el número de hojas estuvo influenciado por los tratamientos siendo la escarificación con lija No. 20 quien mostró los mejores resultados para las variables evaluadas. Respuesta similar a la encontrada por Suárez *et al.* (2012) para “zapatico de la reina” al comparar la longitud de tallo principal en los genotipos azul y blanco.

La longitud del tallo (Tabla14) medida a los 30 días muestra valores superiores en los tratamientos procedentes de la estimulación con las citoquininas sin diferencias con el control, no así en el caso en que se emplean la auxina y giberelina quienes muestran los resultados significativamente inferiores.

Se observa que a los 60 días los mejores resultados tampoco presentan diferencias estadísticas con el control, lo cual reafirma la influencia positiva que tuvieron, en la ruptura de la latencia de las semillas de *C. ternatea* SC-136, las bajas dosis de reguladores de crecimiento utilizadas, sin que se observara variabilidad en las plantas crecidas en condiciones de campo. Aunque se debe destacar que el tratamiento procedente de la aplicación de bencilaminopurina (1 mg/l) mantiene el mejor resultado con 93,18 cm de altura.

Tabla 14. Longitud del tallo rastrero (cm) de las plantas en campo.

Tratamientos	30 días	60 días
Control	48,33 ^{ab}	48,33 ^{abc}
0,5 mg/l KIN	54,40 ^a	55,90 ^{abc}
1 mg/l KIN	53,82 ^a	54,09 ^{abc}
0,5 mg/l KIN + 0,1 mg/l ANA	44,00 ^{abc}	44,31 ^{bc}
0,5 mg/l BAP	44,83 ^{abc}	45,83 ^{bc}
1 mg/l BAP	44,56 ^{abc}	93,18 ^a
1 mg/l BAP + 0,1 mg/l ANA	32,67 ^{cde}	66,60 ^{abc}
0,5 mg/l AG ₃	32,21 ^{cde}	34,50 ^{bc}
1 mg/l AG ₃	27,75 ^{de}	28,33 ^c
1 mg/l AG ₃ + 0,1 mg/l ANA	25,14 ^e	26,14 ^c
0,1 mg/l ANA	39,16 ^{bcd}	78,46 ^{ab}
Error típico	1,31611	4,14260

^{abc} Valores con letras no comunes por columna difieren $P \leq 0,05$ (Duncan, 1955).

Patil *et al.* (2012) partiendo de semillas con un 100 % de viabilidad probada por el análisis de tetrazolio, pero con solo un 20 % de germinación por métodos tradicionales al probar la influencia de reguladores del crecimiento de tipo citoquininas (BA, KIN, TDZ) y auxinas (ANA, AIA, 2,4-D) logran obtener un aumento en la germinación de *Digitalis purpurea* L. superior al 80 %, además de incrementos significativos en el crecimiento de las plantas que influyen en la producción de biomasa total.

CONCLUSIONES

- ✓ Las dosis de reguladores probadas mejoraron significativamente la germinación en semillas de *Clitoria ternatea* L., conservadas en Banco de germoplasma, con niveles superiores al tratamiento control, 1 mg/l de BAP fue el tratamiento de mejor resultado.
- ✓ Los caracteres morfoagronómicos evaluados demuestran que las plántulas germinadas con el estímulo de los reguladores de crecimiento presentan mejores resultados que el tratamiento control.
- ✓ Se logró una eficiente adaptación de las plantas tratadas a condiciones de campo.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar otras accesiones de *Clitoria ternatea* L. y especies conservadas en Banco de germoplasma.
2. Estudiar otros caracteres para confirmar la estabilidad genética de las accesiones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abril-Saltos, R.; Ruiz-Vásquez, T.; Alonso-Lazo, Jatnel & Cabrera-Murillo, Génova. Germinación, diámetro de semilla y tratamientos pregerminativos en especies con diferentes finalidades de uso. *Agron. Mesoam.* 28(3): 703-717, 2017.
2. Akbari, G.; Sanavy, S. & Yousefzadeh, S. Effect of Auxin and Salt Stress (NaCl) on Seed Germination of Wheat Cultivars (*Triticum aestivum* L.) *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10 (15): 2557, 2007.
3. Al-Snafi, A. E. Pharmacological importance of *Clitoria ternatea* – A review. IOSR a. *Journal Of Pharmacy*, 6 (3): 68-83, 2016.
4. Álvarez, O. Origen de las colecciones de leguminosas en Sancti Spíritus, Cuba. En: Leguminosas en la producción agropecuaria, Editorial ACPA, La Habana, p. 9-20, 2014.
5. Alzugaray, C.; Carnevale, N.; Salinas, A. & Pioli, R. Factores bióticos y abióticos que afectan la calidad de las semillas de *Schinopsis balansae* Engl. y *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl. *Rev. Iberoam. Micol*, 24: 142-147, 2007.
6. Amador, K.; Díaz, J.; Loza, S. & Bivián, Y. Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus (cactaceae)*. *Polibotánica*, 35:109-131, 2013.
7. Asrar, Z. Terpenoids and Gibberellic Acids Interaction in Plants. En: Montanaro G and Dichio B (Eds). *Advances in selected plant physiology aspects*, InTech Publisher, Croatia, p. 345-364, 2012.

8. Baena, M.; Jaramillo, S. & Montoya, J. E. Material de apoyo a la capacitación en conservación *in situ* de la diversidad vegetal en áreas protegidas y en fincas. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali, Colombia, p. 51-69, 2003.
9. Baskin, J. & Baskin, C. A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.*
 - a. 14:1-16, 2004.
10. Berjak, Patricia & Pammenter, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. *Plant Sci*, 4(478): 1-9, 2013.
11. Bethke, P. C.; Libourel, I. G; & Jones, R. L. Nitric oxide in seed dormancy and germination. See Ref. 20: 153–75, 2007.
12. Bewley, J. D. & Black, M. Seeds: Physiology of Development and Germination.
 - a. Plenum, New York, 1994.
13. Binder, U. *Clitoria ternatea*. En: Manual de leguminosas de Nicaragua. Edd.
 - a. ESTELI, 1997.
14. Boschi, F.; Latorre, P.; Saldanha, S.; Machado, J.; Bentancur, O. & Moure, S. Importancia de las semillas duras en leguminosas forrajeras producidas en Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 20(2):43-50, 2016.
15. Bradford, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. *Hort Science*, 21:1105-1112, 1986.
16. Capote A., Fundora, Z. & Pérez, O. Influencia de los reguladores del crecimiento sobre la germinación de semillas de cebolla (*Allium cepa* L.) cv. 'Carbe-71'. *Rev. Jardín Bot. Nac.*, 21(2): 203-209, 2000.

17. Capote A.; Fraga, N.; Llorente, O. & Marrero, N. Influencia de los reguladores del crecimiento sobre la germinación de semillas almacenadas de diferentes especies de importancia económica. *Revista Agrotecnia de Cuba*, número especial. Formato digital, 2005.
18. Capote, A.; Fraga, N.; Llorente, O. & Marrero, N. Efecto de reguladores del crecimiento sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas de semillas de *Capsicum annuum* L. *Rev. Agrotecnia de Cuba*, 36(1): 4-9, 2012.
19. Carranza, C.; Castellanos, G. Deaza, D. & Miranda, D. Efecto de la aplicación de reguladores de crecimiento sobre la germinación de *semillas de badea (Passiflora quadrangularis L.) en condiciones de invernadero*. *Rev. Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2): 284-291, 2016.
20. Castro Rincon, E.; Mojica Rodríguez, J. E.; Carulla Fornaguera, J. E. & Lascano Aguilar, C. E. Abonos verdes de leguminosas: integración en sistemas agrícolas y ganaderas del trópico. *Agron. Mesoam.* 29(3): 711-729, 2018.
21. Celis Velázquez, Raquel; Peña Valdivia, Cecilia Beatriz; Luna Cavazos, M.; Aguirre Rivera, J. R.; Carballo Carballo, A. & Trejo López, C. Variabilidad morfológica seminal y del vigor inicial de germoplasma mejorado de frijol. *Agronomía mesoamericana*, 19(2): 179-193, 2008.
22. Chen, S. Y.; Chien, C. T.; Baskin, J. M.; Baskin, C. C. Storage behavior and changes in concentrations of abscisic acid and gibberellins during dormancy break and germination in seeds of *Phellodendron amurense* var. *wilsonii* (*Rutaceae*). *Tree Physiology*, 30: 275-284, 2009.

23. Chiwocha, S. D. S.; Cutler, A. J.; Abrams, S. R.; Ambrose, S. J.; Yang, J.; Ross, A.R. S. & Kermode, A. R.. The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *The Plant Journal*, 42: 35-48, 2005.
24. Coenen, C. & Lomax, T. L. Auxin-cytoquinin interactions in higher plants: Old problema and new tools. Elsevier Science Ltd., 2 (9): 351 – 356, 1997.
25. Condón, F. & Rossi, C. BANCO DE GERMOPLASMA INIA: conservando la diversidad de nuestras plantas. *Revista INIA*, 52:52-55, 2018.
26. Córdova, B. D; Peralta, M. A.; Ramos, S. A. Producción estacional de la asociación de *Digitaria decumbens/Clitoria ternatea* con tres cargas de animales y dos sistemas de utilización. *Pasturas tropicales*, 1:27-31, 1987.
27. Crozier, A. Aspects of metabolism and physiology of gibberellins. *Adv. Bot. Res.* 9: 33-149, 1981.
28. Cruz, Laura. Aplicación de Nanopartículas y Micropartículas de Óxido de Zinc y Sulfato de Fierro, y su Efecto en la Germinación y el Crecimiento de Plántulas de Calabaza (*Cucurbita pepo*). Tesis presentada para obtener el título de Ingeniero Agrónomo en Producción. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, División De Agronomía, Departamento de Fitomejoramiento, Saltillo, Coahuila, México, 2017.
29. Das, M.; Sharma, M.; & Sivan, P. Seed Germination and Seedling Vigor Index in
- a. *Bixa orellana* and *Clitoria ternatea*. *Int. J. Pure App. Biosci*, 5 (5): 15-19, 2017.

30. DaSilva, B. P.; Bernardo, R. R. & Parente, J. P. A new rotenoid glucoside, 6-Deoxyclitoriacetal 11-O-beta-D-Glucopyranoside, from the root of *Clitoria fairchildiana*. *Planta-med. Stuttgart: Georg Thieme Verlag*, vol. 64(3), p. 285, 1998.
31. Del Pozo, J. C.; López-Matas, M. A.; Ramírez-Parra, E. & Gutiérrez, C. Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum*, 123: 173-183, 2005.
32. Deshmukh, S. A. & Desai M. N. Floral changes in *Clitoria ternatea* L. *International Journal of Scientific Research* 6(6): 56, 2017.
33. Dhoran, V. S. & Gudadhe, S. P. Effect of Plant Growth Regulators on Seed Germination and Seedling Vigour in *Asparagus sprengeri* Regel. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1 (7): 6-10, 2012.
34. Diekmann, M. & Putter, C. A. J. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. Stone fruits, No. 16, p. 111, 1996.
35. Doria, Jessica. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento, *Cultivos Tropicales*, 31(1): 74-85, 2010.
36. Duangkhet, M.; Chikoti, Y.; Thepsukhon, A.; Thapanapongworakul, P.; Chungopast, S.; Tajima, S. & Nomura, M. Isolation and characterization of rhizobia from nodules of *Clitoria ternatea* in Thailand. *Plant Biotechnology*, 35: 123-129, 2018.
37. Dueñas, J. M.; Shagarodsky, T.; Fresneda, J. A.; Hernández, Yakelin Fundora & González, J. Caracterización de especies del género *Fusarium* en el cultivo del Garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias Ciudad Habana y La Habana.

Temas de Ciencia y Tecnología, 11(32): 63-66, 2007.

38. Dulloo, M. E., Hanson, J.; Jorge, M. A. & Thormann, I. Regeneration guidelines: general guiding principles. En: Crop specific regeneration guidelines. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Roma, Italia, p. 6, 2008.
39. Duncan, D. B. Multiple range and multiple F. Test. *Biometric*, 11:1, 1955.
40. Ellis, R. H.; Hong T. D. & Roberts, E. H. Seed technology for genebanks. Handbook for Genebanks. International Board for Plant Genetic Resources Institute, Italy, 1(2): 5-66, 1985.
41. Ellis, R. H.; Hong, T. D. & Roberts, E. H. Survival and vigour of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds stored at low and very-low moisture contents. *Ann. Bot.*, 76: 521- 534, 1995.
42. Engels, J. M. M. & Visser, L. (eds). A guide to effective management of germplasm collections. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 6. IPGRI, Rome, Italy, p. 43- 79, 2003.
43. Enrique, Q.; Walkinson; A. R. & Summerfield, R. J. Evaluation descriptors of times to flowering to the genetic characteristic. *Plants Genetic Resources Newsletter*, p. 103, 1995.
44. Fantz, R. P. *Clitoria (Leguminosae) Antillarum*. *Rev. Moscosoa*, 6:152-166. ISSN 0254-6442, 1990.
45. FAO. Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Edición revisada. Roma, p. 17-61, 2014.
46. Finkelstein, R.; Reeves, W.; Ariizumi, T. & Steber, C. Molecular Aspects of

Seed Dormancy. *Annu Rev Plant Biol.* 59: 387-415, 2008.

47. Franco, T. Los Bancos de germoplasma de las Américas. Recursos Naturales y Medio Ambiente. Bioersivity International-Regional Office for the Americas c/o Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Apartado Aéreo 6713. Cali, Colombia, (53):81–84, 2008.
48. Frison, E. A. & Taher, M. M. (eds.) FAO/IBPGR Technical Guidelines for the Safe Movement of *Citrus* Germplasm. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Board for Plant Genetic Resources, Rome, p.1-50, 1991.
49. García, Leyanis.; de Feria, Manuel. & Acosta, K. Artículo Científico
a. *Bioteconología Vegetal*, 7(2): 67 - 79, 2007.
50. García, Lidia. Evaluación del rendimiento de materia seca, valor nutritivo y concentración de taninos condensados en cuatro leguminosas tropicales en dos épocas del año. Tesis en opción al título académico de Maestra en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico. Colegio Postgraduados, Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Tabasco, México, 2014.
51. García Ferrera, Lidia; Bolaños Aguilar, E. D.; Ramos Juárez, J.; Osorio Arcec, M.; Lagunes Espinoza, Luz del Carmen. Rendimiento y valor nutritivo de leguminosas forrajeras en dos épocas del año y cuatro edades de rebrote. *Rev Mex Cienc Pecu* 6(4):453-468, 2015.
52. Garza, T. R.; Portugal, G. A. & Ballesteros, W. H. Evaluación en pastoreo de asociaciones de zacates y leguminosas utilizando vaquillas de razas europeas en clima tropical. *Téc Pecu Méx*, 23:7-11, 1972.

53. Godo, T.; Komori, M.; Nakaoki, E.; Yukawa, T. & Miyoshi, K. Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture *in vitro*. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 46: 323-328, 2010.
54. Gollen, B.; Mehla, J. & Gupta, P. *Clitoria ternatea* Linn: A Herb with Potential Pharmacological Activities: Future Prospects as Therapeutic Herbal Medicine. *J Pharma Reports*, 3(1): 141, 2018.
55. Gómez, S. M. & Kalamani, A. Butterfly Pea (*Clitoria ternatea*): A Nutritive Multipurpose Forage Legume for the Tropics - An Overview. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2 (6): 374-379, 2003.
56. Gómez-Campo, C. A guide to efficient long term seed preservation. *Monographs ETSIA, Univ. Politécnica de Madrid*, 170: 1-17, 2007.
57. Gómez-Campo, C.(a) Erosion of genetic resources within seed genebanks: the role of seed containers. *Seed Science Research*, 16: 291-294, 2006.
58. Gómez-Campo, C.(b) Long term seed preservation: updated standards are urgent.
- a. *Monographs ETSIA, Univ. Politécnica de Madrid*, 168: 1-4, 2006.
59. Graeber, K., Nakabayashi, K.; Miatton, E.; Leubner-Metzger, G. & Soppe, W. Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant Cell Environ*, 35: 1769-1786, 2012.
60. Greuter, W. & Rankin, Rosa. Vascular plants of Cuba. A preliminary checklist. Second, updated Edition of The Spermatophyta of Cuba, with Pteridophyta added. Ed. Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin, Germany, p. 159, 2017.

61. Guangwu, Z & Xuwen, J. Roles of Gibberellin and Auxin in Promoting Seed Germination and Seedling Vigor in *Pinus massoniana*. *Forest Science*, 60(2): 367-373, 2014.
62. Gutiérrez, B. & Koch, Laura. Conservación de germoplasma *ex situ*: Protocolos y estrategias para la mantención de un banco *in vitro*. *Ciencia e investigación Forestal*, 21(1): 69-82, 2015.
63. Gutiérrez, Susana; Carmona, M. A. & Reis, E. M. Estudio preliminar sobre métodos de detección de *Microdochium oryzae* en semillas de arroz. *Tropical Plant Pathology*, 34 (1): 42-44, 2009.
64. Haberer, G. & Kieber, J. Cytokinins. New Insights into a Classic Phytohormone.
 - a. *Plant Physiology*, 128: 354–362, 2002.
65. Hentrich, M., Boettcher, C. & Duchting, P. The jasmonic acid signaling pathway is linked to auxin homeostasis through the modulation of YUCCA8 and YUCCA9 gene expression. *Plant J.* 74: 626-637, 2013.
66. Hernández, A.; Perez, J. M.; Bosch, D. & Castro, N. Clasificación de los suelos de Cuba. Mayabeque, Cuba: Instituto de Suelos, Ediciones INCA, 2015.
67. Herrera, J.; Alízaga, R.; Guevara, E. & Jiménez, V. Germinación y crecimiento de la planta. Editorial Universidad de Costa Rica, San José, CRC, 2006.
68. Hopkins, W. G. & Hüner N. P. A. Introduction to Plant Physiology. University of Western Ontario, USA. 2009.
69. ISTA. International rules for seed testing. Bassersdorf : ISTA, p. 60, 2012.
70. ISTA. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*, 21, Supplement. International Seed Testing Association, Suiza, p. 288, 1993.

71. Jaramillo, S. & Baena, M. Material de apoyo a la capacitación en conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali, Colombia, 2000.
72. Jarma, A.; Arbeladez, J. & Clavijo, J. Germinación de *Ischaemum rugosum* Salisb. en respuesta a estímulos ambientales y químicos. *Rev. Temas Agrarios*, 12(2):31-41, 2007.
73. Krikorian, A. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Eds. Roca, a. W. y Mroginski, L. CIAT, Cali, Colombia, p.65-67, 1993.
74. Kumar, G.; Chahal, J. & Bhatia, M. *Clitoria ternatea* (L.): Old and new aspects. a. *Journal of Pharmacy Research*, 3 (11): 2610-2614, 2010.
75. Lata Zingare, M.; Lata Zingare, P.; Ku Dubey, A. & Ansari, A. *Clitoria ternatea* (Aparajita): A Review of the Antioxidant, Antidiabetic and Hepatoprotective. *Int J Pharm Bio Sci*, 3(1): 203-213, 2013.
76. Laurena, A. C. & Revelleza, M. J. R. Polychenol Phitate, cyanogenic and tripsininhibitor activity. University of felippines, vol. 7(3), p. 194-202, 1994.
77. Lezcano, J. Programa Integral de Ganadería. Proyección Estratégica hasta el 2015. MINAG, Cuba. Ed. Liliana, La Habana, p. 23, 2010.
78. Lin, J. L.; Ruangrunsi, N.; Cordeu, N.; Shied, H. L.; you, M. & Pezzuto, J. M. 6- Deoxyclitoriacetal from *Clitoria macrophylla*. *Phytochemistry-Oxford*. Oxford, New York: Pergamon Press, Fi61, 31 (12): 4329-4331, 1992.
79. Lucas, E. D. & Souto, S. M. Quatity and composition of fatty acids in seeds of varieties of *Clitoria ternatea* L. *Abstracs on Tropical Agriculture*, vol. 3(1), 1997.

80. Mac Millan, J. Hormonal regulation of development. Molecular aspects of plant hormones. Encyclopedia of plant physiology, new series. Springer Verlag, Nueva York, p. 9, 1984.
81. Macedo, M. R. L. & Xavier-Filho, J. Purification and characterization of trypsin inhibitors from seeds of *Clitoria ternatea*. *J. Sci. Food Agric. Essex: Elsevier Applied Science*, 58 (1): 55-58, 1992.
82. Mayo-Mosqueda, A.; Espinosa-Moreno, Judith; Centurión-Hidalgo, Dora & J. G. Cazares-Camero. Estrategias para mejorar la germinación de semillas de *Calyptrogyne ghiesbreghtiana* (Linden & H. Wendland). *Polibotánica*, 43: 1-10, 2017.
83. Medel, C. I. Evaluación de la densidad de plantas en el rendimiento y calidad de semilla de *Clitoria ternatea* cv. Tehuana. Tesis presentada en opción al título de Licenciado en Zootecnia. Oaxaca, México: Universidad del Papaloapan, 2008.
84. Mero, O. F.; Cuásquer, E.; García, Lucy; Ramos, M. P. & Jiménez, A. Efecto de reguladores de crecimiento tipo auxínico para la regeneración de tejido vegetal en *Bursera graveolens*. *Rev. Cubana de Ciencias Forestales*, 5(3):259-269, 2017.
85. Miransari, M. & Smith, D. L. Plant hormones and seed germination. *Environ. Exp. Bot.* 99: 110-121, 2014.
86. Murillo, L.; Chacón, E.; Ramírez, J.; Espinoza, A.; Guevara, J.; Cedeño, D. M. & López Cedeño, K. M. Evaluación del Kudzú (*Pueraria phaseoloides*) y *Clitoria*

- a. *ternatea* en diferentes estados de madurez. *Rev. Electrón. Vet.* 16(10): 1-8, 2015.
87. Murray, G.; Swensen J. B. & Gallian J. J. Emergence of sugar beet seedlings at low soil temperature following seed soaking and priming. *Hort. Sci.*, 28: 31, 1993.
88. Nelson, D. C.; Riseborough, J. A.; Flematti, G. R. ; Stevens, J, Ghisalberti, E. L.; Dixon, K. W. & Smith, S. M. Karrikins Discovered in Smoke Trigger Arabidopsis Seed Germination by a Mechanism Requiring Gibberellic Acid Synthesis and Light. *Plant Physiology*, 149(2): 863-873, 2009.
89. Nikolić, R.; Mitić, N.; Miletić, R. & Nešković, M. Effects of cytokinins on *in vitro* seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25: 187-194, 2006.
90. Nodarse, O.; Santana, I.; Cornides, M. T.; Figueredo, Y.; Héctor, E. & Rodríguez,
a. R. Comparación de probaciones de caña de azúcar conservadas *in vitro* e *in situ*. Libro de resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones. Ciudad de la Habana, 1998.
91. Oliveira, J.; Prendes, E.; Khouri, A. & García, J. Evaluación de un método de escarificación mecánica en la germinación de semillas de leguminosas pratenses. *Pastos*, 38:179-191, 2007.
92. Oracz, K.; El-Maarouf-Bouteau, H.; Kranner, I.; Bogatek, R.; Corbineau; F. & Bailly,
a. C. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of

cellular signaling during germination. *Plant Physiology*, 150 (1): 494-505, 2009.

93. Painting, K. A.; Perry, M. C.; Denning, R. A. & Ayad, W. G. Guía para la Documentación de Recursos Genéticos. Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, p. 57-93, 1993.
94. Patil, J. G.; Ahire; M. L. & Nikam, T. D. Influence of plant growth regulators on seed germination and seedling development of *Digitalis purpurea* L. The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology 6 (Special Issue 1): 12-18, 2012.
95. Pérez-Rodríguez, J. Luis; Torrecilla-Guerra, G.; Ruiz-Padrón, O. & Martínez-Montero, M. Ruptura de dormancia en semillas de especies del género *Nicotiana*. *Centro Agrícola*, 41(1): 53-60, 2014.
96. Pérez García, F. & Pita Villamil, J. M. Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaria General de Estructuras. Hojas divulgadoras No. 2112, p. 1-15, 2001.
97. Pullin, A. S.; Sutherland, W.; Gardner, T.; Kapos, Valerie & Fa, J. E. Conservation priorities: identifying need, taking action and evaluating success. Key Topics in Conservation Biology, First Edition. Edited by David W. Macdonald and Katherine J. Willis, p. 1-22, 2013.
98. Quintana, Maribel; Capote, Amelia, Napoles, J. A.; Álvarez, Orquidia; Ramos, Yamilka; Becquer, C. & Galdo, Yaldreisy. Efecto de dos reguladores de crecimiento y condiciones de iluminación en la germinación de semillas conservadas de *Clitoria ternatea*. *Biotecnología Vegetal*, 13(2): 113 - 119, 2013.

99. Quintana, M.; Carbonell, A.; Álvarez, J. L. & Nápoles, J. A. Técnicas biotecnológicas aplicadas al estudio de las leguminosas. En: Leguminosas en la producción agropecuaria, p. 34-52. Editorial ACPA, La Habana, 2014.
100. Ramírez, M. & Suárez, H. Evaluación de tratamientos pregerminativos y caracterización morfológica de plántulas de “zapatico de la reina” (*Clitoria ternatea* L.) cultivadas en bandeja. *Rev. Fac. Agron.*, 1: 249-259, 2014.
101. Ramos, Yamilka; Álvarez, Orquidia; Quintana, Maribel; Vega, Susana & Palmero,
a. L. A. Diversidad de accesiones de conchita azul (*Clitoria ternatea* L.) recolectadas en zonas ganaderas de Cuba. *Ciencia y Tecnología Ganadera* 2(1): 19-24, 2008.
102. Rao, N. K.; Hanson, J.; Dulloo, M. E.; Ghosh, K.; Novell, D. & Larinde, M. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioversity International, Roma, Italia, p. 57-59, 2007.
103. Reed, B. M.; Engelmann, F.; Dulloo, M. E. & Engels, J. M. M. Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 7. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, p.1-35, 2004.
104. Reino, J. Efectos de tratamientos de hidratación-deshidratación y de choque ácido sobre la germinación y emergencia en *Leucaena leucocephala*. Tesis en opción al título académico de Maestra en Master en Pastos y Forrajes. Universidad De Matanzas “Camilo Cienfuegos”, Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”, 2005.

105. Reveles, L. R. & Velásquez, R. Patrimonio fitogenético: Banco de germoplasma de semillas ortodoxas del Campo Experimental Zacatecas. Folleto Técnico. CIRNOC–INIFAP (81):44, 2017.
106. Revilla, P.; Butrón, A.; Malar, R. A.; Ordás, A. Relationships among kernel weight, early vigor, and growth in maize. *Crop Science*, 39: 654-658, 1999.
107. Rocuant, T. Efecto de giberelina y de tiourea en la germinación de semillas: Especies del género *Nothofagus*. *Bosque*, 5(2):53-58, 1984.
108. Rojas, S.; Olivares, J.; Jiménez, R.; Hernández, E. Manejo de praderas asociadas de gramíneas y leguminosas para pastoreo en el trópico. *Revista Electrónica de Veterinaria* 6(5), 2005.
109. Rosselló, J. M. Elena & Fernández de Gorostiza, M. Guía técnica para ensayos de variedades en campo. Volumen 75 de Estudio FAO: Producción y protección vegetal. Ed. Food & Agriculture Org., p. 12, 1986.
110. Ruesga, Idania; Peña, E.; Expósito, Irene; Gardon, D. Libro de experimentación agrícola. Editorial Universitaria, Ciudad Habana, Cuba, p. 4-5, 2005.
111. Saldívar-Iglesias, P.; Laguna-Cerdas, A.; Gutiérrez-Rodríguez, F. & Domínguez-Galindo, M. Ácido giberélico en la germinación de semillas de *Jaltomata procumbens* (Cav.) J. L. Gentry. *Agron. Mesoam*, 21:327-331, 2010.
112. Sanabria, D.; Silva, R.; Oliveros, M. & Barrios, H. Escarificación química y térmica de semillas subterráneas de *Centrosema rotundifolium*. *Bioagro*, 13:117-124, 2001.

113. Sánchez, J. A.; Orta, R. & Muñoz, Bárbara. Tratamientos Pre germinativos de hidratación-deshidratación de las semillas y sus efectos en plantas de interés

- a. agrícola. Universidad de Costa Rica San José, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 25(001): 67-91, 2001.
114. Sánchez, Y. & Ramírez, M. Tratamientos pregerminativos en semillas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. y *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. *Rev. Fac. Agron. Caracas*, 23 (3): 5-12, 2006.
115. Skerman, P. J.; Cameron, D. & Riveros, F. Leguminosas forrajeras tropicales. FAO. Roma, Italia Colección FAO. Producción y Protección Vegetal. (2): 286- 288, 1991.
116. Stepanova, A. N.; Yun, J.; Robles, L. M.; Novak, O.; He, W.; Guo, H.; Ljung, K. & Alonso, J. M. The Arabidopsis YUCCA1 Flavin Monooxygenase Functions in the Indole-3-Pyruvic Acid Branch of Auxin Biosynthesis. *The Plant Cell*, 23: 3961-3973, 2011.
117. Stirk, W. A.; Gold, J. D., Novák, O.; Strnad, M. & Van Staden, J. Changes in endogenous cytoquinins during germination and seedling establishment of *Tagetes minuta* L. *Plant Growth Regulation*, 47: 1-7, 2005.
118. Stojičić, D.; Janošević, D.; Uzelac, B.; Čokeša, V. & Budimir, S. *In vitro* zygotic embryo culture of *Pinus peuce* Gris.: Optimization of culture conditions affecting germination and early seedling growth. *Archives of Biological Sciences Belgrade*, 64: 503-509, 2012.
119. Suárez, Hallely; Mercado, W.; Ramírez, Maribel; Bracho, Belkys; Rivero, J. & García, D. E. Caracterización morfoagronómica y evaluación del contenido proteínico en dos genotipos de *Clitoria ternatea* L. cultivados en un sistema de espalderas. *Pastos y Forrajes*, 35 (4): 365-380, 2012.

120. Taiz, L. & Zeiger, E. Phytochrome and Light Control of Plant Development. *Plant Physiology* 4th Ed. p. 375-492, 2006.
121. Thomas, J. E. *Musa Net Technical Guidelines for the Safe Movement of Musa Germplasm*. 3rd Edition. Bioversity International, Rome, p. 1-60, 2015.
122. Tiryaki, I.; Korkmaz, A.; Nas, M. & Ozbay, N. Priming combined with plant growth regulators promotes germination and emergence of dormant *Amaranthus cruentus* L. seeds. *Seed Sci. Technol*, 33: 569, 2005.
123. Tiryaki, I.; Ozbay N.; Nuri Nas M. & Korkmaz A. La inclusión de benziladenina en solución acondicionadora promueve la germinación de semillas de pasto Kentucky (*Poa pratensis* L.). *Rev. Cub. de Ciencia Agrícola*, vol. 40(2):243- 248, 2006.
124. Tsatsakis, A. & Schitilman, M. Phytoactive polymers: new synthetic plant growth regulators. En: *Morphogenesis in plants*. K. Roubelakis-Angelakis y T. Kiem (eds.). Plenum Press, 5:115–128, 1993.
125. Velázquez, H. Estudio fisiológico en familias prolíficas de un lote de producción de semilla de la variedad de maíz JAGUAN. Tesis de Maestría Profesional, especialidad en Granos y Semillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, p. 13, 2014.
126. Vijay, N. & Kumar, A. Improving growth and productivity of *Asparagus racemosus*: Effect of N.P.K. and Growth regulators, *Phytomorphology*, 55 (1&2), 2004.
127. Villanueva, J. F. *Clitoria*. Leguminosa forrajera de excelencia para el trópico mexicano. Folleto Técnico (1) p. 1-15, 2000.

128. Villanueva, J. F.; Bonilla, J. A.; Vidal Rubio Ceja, J. & Bustamante Guerrero, J. J. Agrotecnia y utilización de *Clitoria ternatea* en sistemas de producción de carne y leche. *Téc. Pecu. Méx.* 42(1): 79-96, 2004.
129. Weitbrecht, K.; Müller, K.; Leubner-Metzger, G. & Darwin Review. First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 62(10): 3289- 3309, 2011.
130. Wünschová, A.; Beòová, V.; Vlašínová, H. & Havel, L. Dormancy of *Nicotiana benthamiana* seeds can be broken by different compounds. *Biologia*, 64(4): 705-710, 2009.
131. Yamauchi, Y.; M. Ogawa; A. Kuwahara; A. Hanada; Y. Kamiya; & S. Yamaguchi: Activation of gibberellin biosíntesis and response pathways by low temperature during imbibitions of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell*, 16: 367-78, 2004.