

**ESTUDIOS EN LA GERMINACIÓN Y PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE TRES  
ESPECIES DE LEGUMINOSAE: *Calopogonium sp.*, *Stylosantes capitata* Y *Cassia  
moschata*.**

**STUDIES ON THE GERMINATION AND *IN VITRO* PROPAGATION OF THREE  
LEGUMINOSAE SPECIES: *Calopogonium sp.*, *Stylosantes capitata* AND *Cassia  
moschata*.**

**Melvin Yajaira Maiquetía Mendoza, MSc.**

Máster en Ciencias Biológicas (Venezuela).

Docente de la Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

maiquetiamelvin@gmail.com

**Teresa Edith Vargas Cedeño, Ph.D.**

Doctora en Ciencias Biológicas (Venezuela).

Bióloga del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Biología Experimental. Facultad  
de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, Venezuela.

teoriedu@gmail.com

**Marcia Toro García, Ph.D.**

Doctora en Ciencias Biológicas (España).

Bióloga del Laboratorio de Estudios Ambientales (IZET) de la Facultad de Ciencias de la  
Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

marcia.toro@ciens.ucv.ve

**Eva Cristina García de García, Ph.D.**

Doctora en Ciencias Biológicas (Venezuela).

Laboratorio de Biotecnología Vegetal (IBE) de la Facultad de Ciencias de la Universidad  
Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

eva.cristina.garcia@gmail.com

**ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN**

Recibido: 2 de septiembre de 2020

Aceptado: 12 de octubre de 2020

**RESUMEN**

*Calopogonium sp.*, *Stylosanthes capitata* y *Cassia moschata*, leguminosas de importancia en los ecosistemas de sabanas, presentan limitaciones en su cultivo debido a la latencia de sus semillas. En este trabajo se analizó la germinación de las semillas en cámara húmeda, y en



condiciones *in vitro*, cultivándolas en medio Murashige y Skoog (1962). Las semillas previamente se sometieron a escarificación con etanol (*Calopogonium* sp.), e inmersión en ácido sulfúrico (*C. moschata* y *S. capitata*). En cámara húmeda, los valores de germinación fueron: *Calopogonium* sp., 60%, *C. moschata* 40%, de *S. capitata* 8%. La germinación *in vitro*, a los 21 días de cultivo para *Calopogonium* sp., fue del 100%, para *S. capitata* de 85% y para *C. moschata* de 65%. Para establecer una propagación masiva, se cultivaron *in vitro*, microesquejes aislados de plántulas obtenidas por germinación. Se analizaron tres medios de multiplicación constituidos por medios MS (1962) suplementados con benciladenina (0,5; 1; 1,5 mg L<sup>-1</sup>), denominados MS1, MS2 y MS3, respectivamente. *Calopogonium* sp., en MS2 y MS3 presentó formación y multiplicación de brotes, siendo mayor en MS3 (5 brotes/explante). *C. moschata* formó brotes en MS3 (1,66 brotes/explante). *S. capitata* formó brotes en los tres medios, alcanzando 7,5 brotes/explantes en el MS3.

Palabras clave: Plantas forrajeras, semilla, latencia, cultivo *in vitro*, microesquejes.

## ABSTRACT

*Calopogonium* sp., *Stylosanthes capitata* and *Cassia moschata*, are important legumes in savanna ecosystems that present limitations in their crop production, due to the dormancy of their seeds. In this investigation, we analyzed the seeds germination, in a humid chamber, and *in vitro* conditions in Murashige and Skoog (1962) medium. The seeds were previously subjected to scarification with ethanol (*Calopogonium* sp.), and immersion in sulfuric acid (*C. moschata* and *S. capitata*). In the humid chamber, the germination values were 60%, *Calopogonium* sp., 40%, *C. moschata* and 8% *S. capitata*. Germination *in vitro*, at 21 days of culture for *Calopogonium* sp., was 100%, for *S. capitata* 85% and for *C. moschata* 65%. To establish a massive propagation, isolated micro-cuttings of seedlings obtained by germination were cultivated *in vitro*. Three multiplication media consisting of MS media (1962) supplemented with benzyladenine (0.5; 1; 1.5 mg L<sup>-1</sup>), named MS1, MS2 and MS3, respectively, were tested. *Calopogonium* sp., growing in MS2 and MS3 media showed formation and multiplication of shoots. The highest value was obtained in MS3 (5 shoots / explant). *C. moschata* formed shoots in MS3 (1.66 shoots/explant). *S. capitata* formed shoots in all three media, reaching 7.5 shoots/explants in MS3 medium.

Keywords: Forage plants, seeds, latency, *in vitro* culture, micro-cuttings.

## INTRODUCCIÓN

*Calopogonium* sp., *Stylosanthes capitata* y *Cassia moschata*, son leguminosas (Fabaceae-Leguminosae), de gran importancia en los ecosistemas de sabanas, con alto contenido de proteínas para el animal en pastoreo y pueden inducir cambios en suelos de baja fertilidad debido

al suministro de nitrógeno. *Cassia moschata* es un árbol de interés como especie autóctona de las sabanas, por su capacidad de enriquecer el suelo con nitrógeno (N) y por su alto contenido proteico de su fruto, como alimento para el ganado. Estas especies son muy importantes en el establecimiento de sistemas agroforestales y silvopastoriles, en los cuales se incluyen árboles forrajeros leguminosos debido a sus calidades multipropósito (Alonso, 2011). De esta forma se logran sistemas agrícolas, con un enfoque ecológico, técnico cultural y socio económico, a fin de mejorar el ciclaje de nutrientes del sistema, favorecer la biodiversidad, optimizar el uso de los recursos locales y recurrir al conocimiento tradicional, para lograr el manejo sustentable de los ecosistemas (Toro y Hernández, 2008; León y Altieri, 2010).

Es conocido que la mayoría de las semillas de Fabaceae-Leguminosae tienen como característica común la presencia de una cubierta dura, que le impide germinar rápidamente, aunque se les sitúe en condiciones favorables. Esta característica, denominada latencia, puede ser causada por la impermeabilidad del tegumento (Hilhorst et. al. 2010). La latencia suele ser un mecanismo de supervivencia en determinadas condiciones climáticas, tales como: temperaturas muy bajas, déficit hídrico, entre otros (Bentsink y Koornneef, 2008; Dora, 2010).

En función de ello, se evalúa en este trabajo, la germinación en cámara húmeda e *in vitro* de las semillas de las especies antes mencionadas, con el fin de mejorar el porcentaje de germinación de las mismas.

Adicionalmente, tomando en cuenta el hecho de que las especies de leguminosas del presente estudio: *Calopogonium sp.*, *Stylosanthes capitata* y *Cassia moschata*, tienen un importante valor económico y ecológico, pero que presentan un bajo porcentaje de germinación en condiciones naturales y poseen baja tasa de regeneración, surge la necesidad de incrementar su propagación, y conservación como recurso fitogenético, con el fin de suplir estos requerimientos agroecológicos de una forma más rápida y eficiente, que las técnicas utilizadas convencionalmente en la agricultura.

Basados en esas consideraciones en el presente trabajo se diseñaron protocolos para la propagación vegetativa *in vitro*, la cual ha demostrado ser una alternativa biotecnológica atractiva para lograr un alto número de plantas en corto tiempo (Escandón et al., 2003; Pérez et al., 2006; Trujillo, 2008).

La propagación *in vitro* está basada en el cultivo de secciones de plantas, embriones, órganos, tejidos, células y protoplastos, en medios nutritivos, bajo ambiente estéril en los cuales se les proporciona artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Pierick, 1990). Por lo cual es considerado como un conjunto de biotécnicas y métodos que emplea células vegetales con potencialidad de

diferenciación, y un balance hormonal, para regenerar un nuevo individuo. Con esta manipulación las plantas se pueden multiplicar rápida y masivamente, y también obtenerse plantas libres de patógenos (bacterias, nematodos, virus y hongos), (Castillo, 2004), de esa forma se incrementa significativamente los niveles de productividad de muchos cultivos.

En esta investigación se logró establecer dos protocolos para aumentar la producción de *Calopogonium* sp., y *Stylosanthes capitata* y *Cassia moschata*, (1)- establecimiento de condiciones para incrementar el porcentaje de germinación de la semilla, y (2)- multiplicación clonal *in vitro* a partir de microesquejes, de plántulas obtenidas mediante germinación. La combinación de los mismos permite obtener un aumento sustancial de la producción de estas leguminosas de gran interés para los ecosistemas de sabana.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en dos fases:

1. Estudios para incrementar el porcentaje de germinación de las semillas.
2. Micropropagación clonal de estas especies nativas de sabana, mediante el cultivo *in vitro* de microesquejes obtenidos de las vitroplantas. Las plantas aquí obtenidas se usaron en los estudios de climatización asistida por microorganismos, cuyos resultados se expondrán en otra publicación.

### Estudios para incrementar la germinación de semillas de *Calopogonium* sp., *Cassia moschata* y *Stylosanthes capitata*

#### **Material vegetal**

En el caso de *C. moschata* se emplearon semillas de frutos maduros (legumbres) que se colectaron en la Estación Experimental La Iguana, adscrita a la Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez, ubicada en el municipio Santa María de Ipire, al sureste del Estado Guárico (llanos centro oriental de Venezuela). Las semillas de *Calopogonium* sp., y *S. capitata* fueron adquiridas de forma comercial.



Figura 1. Aspecto general de las plantas en estudio

Fuente: Elaboración propia

### **Desinfección de las semillas con hipoclorito de sodio.**

Las semillas se aislaron y dependiendo de la especie, se les aplicó un método de preparación y desinfección previo a los ensayos de germinación. Se emplearon 100 semillas de cada especie para cada ensayo. Todas las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (NaClO) al 3,5% por 2 min, excepto las de *C. moschata* expuestas por 5 min; seguidamente se lavaron con agua destilada hasta eliminar residuos de cloro.

### **Escarificación química de las semillas.**

*Calopogonium* sp. Se seleccionaron 100 semillas, que no presentaron hoyos ni deformaciones y se colocaron en 10 mL<sup>-1</sup> de etanol al 70% por 1 min. Posteriormente se descartó el solvente. Las semillas fueron lavadas con agua destilada 5 veces y por último con agua destilada estéril por cinco minutos).

*Cassia moschata*: Las semillas fueron extraídas manualmente del fruto maduro, eliminándose mecánicamente una envoltura de textura pegajosa, luego se seleccionaron las que no presentaban deformaciones ni perforaciones. Las semillas se sumergieron en ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado al 98%. Los tiempos de exposición fueron 4, 8, 16 y 34 min. Las semillas se agitaron con una varita de vidrio cada 5 min. Luego se les descartó el ácido y se lavaron durante cinco minutos con agua destilada y por último agua estéril. De cada tratamiento de inmersión se seleccionaron 50 semillas.

Se designaron según la clasificación de Sanabria et al. 2004, como semillas duras, que no germinaron en condiciones favorables, ni siquiera con tratamiento adecuado para romper la latencia y se caracterizaron por permanecer firmes y aparentemente viables.

*Stylosanthes capitata*: Las semillas de *S. capitata* procedían de una compra comercial. Estas se lavaron con agua destilada. Se evaluaron cinco tratamientos distribuidos a razón de 250 semillas con unidades experimentales de 50 semillas por tratamiento. Las semillas fueron sumergidas en 100 mL, agregándoles ácido sulfúrico al 40%, durante 5, 10, 15, 20 y 25 minutos de exposición y un grupo sin escarificación (Control). Después del tiempo de exposición las semillas se lavaron durante 5 min con agua destilada. El último enjuague corresponde al agua estéril. Una vez desinfectadas y escarificadas todas las semillas de *Calopogonium*, *C. moschata* y *S. capitata*, se ensayaron dos métodos de germinación.

### ***Método de germinación in vitro en medio de cultivo.***

Las semillas se sembraron en un medio de cultivo que contenían sales Murashige and Skoog (MS 1962), enriquecido con: tiamina-HCl, piridoxina-HCl, ácido nicotínico a una concentración de 1 mg L<sup>-1</sup>, 1 mg L<sup>-1</sup> y 1 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, 100 mg L<sup>-1</sup> de Mio-inositol.

Se agrega además 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; 60 mg L<sup>-1</sup> de cisteína como agente anti-oxidante (Trujillo et al. 2002). El pH del medio fue ajustado a 5,8 con NaOH y/o HCl. Se usó como agente gelificante para medios nutritivos 8 g L<sup>-1</sup> de agar, previamente disuelto en el microondas. Se sirvieron 30 mL del medio de cultivo en frascos de vidrio y se esterilizaron por 20 minutos en una autoclave a 120 °C y 15 lb de presión. A los medios una vez esterilizados, se le agregó antibiótico cefatoxima a una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup>.

Una vez realizada la siembra, los cultivos fueron colocados en una cámara de crecimiento con luz fluorescente (50 μmolm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y temperatura de 23 ±1 °C. Se determinó el porcentaje de germinación durante el lapso de 21 días.

### ***Método de germinación en cámara húmeda.***

Las semillas escarificadas se colocaron en capsulas de Petri sobre hojas de papel de filtros esterilizados y humedecidos con agua destilada estéril, las placas se envolvieron con envoplast para evitar contaminación y deshidratación. Cada 3 días se realizaba un riego con agua estéril.

Las cápsulas de Petri se llevaron a la cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones que la germinación en cultivo *in vitro*. Se realizaron medidas periódicas de crecimiento durante 21 días.

## **Micropropagación clonal de estas especies nativas de sabana, mediante el cultivo in vitro de microesquejes obtenidos de las vitroplantas**

### ***Selección de los microesquejes***

Una vez obtenidas las plantas germinadas *in vitro* en condiciones asépticas, de *Calopogonium* sp., *C. moschata* y *S. capitata* con una edad de cinco semanas y con altura de 6 a 7 cm aproximadamente, se procedió a aislar microesquejes (explantos) de un nudo (*Calopogonium*), o dos nudos (*C. moschata* y *S. capitata*) de aproximadamente 1-2 cm de longitud. Se sembraron cuatro microesquejes/envase en medios de multiplicación para aumentar el número de vitroplantas.

## **Selección de los medios de cultivo**

Los microesquejes fueron cultivados en medio MS (1962), al cual se le añadieron diferentes concentraciones de benciladenina (BA) (Tabla 1). Un grupo se cultivó en un medio sin hormonas (control). Una vez realizada la siembra, los cultivos se incubaron en un a una cámara de crecimiento durante 5 semanas a 28°C y fotoperiodo de 16 horas luz /8 horas oscuridad.

Tabla 1

Concentraciones de BA ( $\text{mg L}^{-1}$ ) utilizadas en la fase de multiplicación de *Calopogonium sp*, *C. moschata* y *S. capitata*

Tratamiento	BA( $\text{mg L}^{-1}$ )
MS1	0,5
MS2	1
MS3	1,5
MS	0

Nota. MS Medio de control; MS1 y MS2, (Pérez et al 2006). MS3, (Trujillo 2008). Fuente: Elaboración propia

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se aplicó una prueba de análisis de varianza (ANOVA), de una o dos vías según sea el caso y una prueba de Duncan con la aplicación del programa Statistica 5.5  $p < 0.05$ . Se realizó para todos los tratamientos el método de la mínima diferencia significativa (LSD).

## **ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

### **Germinación in vitro de semillas de *Calopogonium sp*, *Cassia moschata* y *Stylosanthes capitata***

#### **Desinfección de las semillas**

Las semillas de las tres especies sometidas a desinfección con hipoclorito al 3.5% alcanzaron bajos porcentajes de contaminación, 10 a 15%, lo que permitió continuar con las demás etapas del trabajo, ya que el 80% de las semillas se encontraron libres de contaminantes.

#### **Método de escarificación química:**

- *Calopogonium sp*. En el tratamiento con alcohol al 70%, se obtuvo el 90% de semillas sin dureza.
- *Cassia moschata*. El comportamiento de las semillas durante su exposición en ácido mostró diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 2), resultando mayor el efecto a los

16 minutos de inmersión disminuyendo así la dureza de las semillas en un 80%.

- *Stylosanthes capitata*. Cuando las semillas permanecieron entre cinco y diez minutos tratadas con el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 40% presentaron los valores más bajos de germinación. Al aumentar el tiempo de inmersión de las mismas se favoreció la germinación (Tabla 3), las cuales incrementaron el porcentaje y se mantuvieron altos hasta los 25 minutos de tratamiento.

Tabla 2

Efecto de la inmersión con ácido sulfúrico concentrado sobre la germinación semillas *Cassia moschata*

Tiempo en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (min.)	Semillas germinadas (%)	Semillas duras (%)	Semillas muertas (%)
4	1	70b	8a
8	3a	78b	20b
16	80b	5a	20
32	70b	3	20

Nota. Medias con letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Duncan (p<0,05).

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3

Efecto de la inmersión con ácido sulfúrico al 40% sobre la germinación de semillas de *Stylosanthes capitata*

Tiempo en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (min.)	Semillas germinadas (%)	Semillas duras (%)	Semillas muertas (%)
5	4a	70b	10b
10	9	78	17
15	15b	5	20b
20	54	6	5
25	60c	6a	5a

Nota. Medias con letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Duncan (p<0,05).

Fuente: Elaboración propia

### **Germinación in vitro en medio de cultivo.**

Para el día 5 de tratamiento no se reportaron evidencias de germinación para *C. moschata* ni diferencias significativas entre las especies de *Calopogonium* sp. y *S. capitata* (25%). El mayor porcentaje se observó en las semillas de *Calopogonium* para el día 14 (80%), el cual fue significativamente mayor que el porcentaje de las semillas de *S. capitata* (60%) y que *C. moschata* (10%). Para el día 21 de cultivo, *Calopogonium* sp., había alcanzado el 100% de germinación mientras que *S. capitata* mostró un 80% y *C. moschata* un 60% (Figura 2).

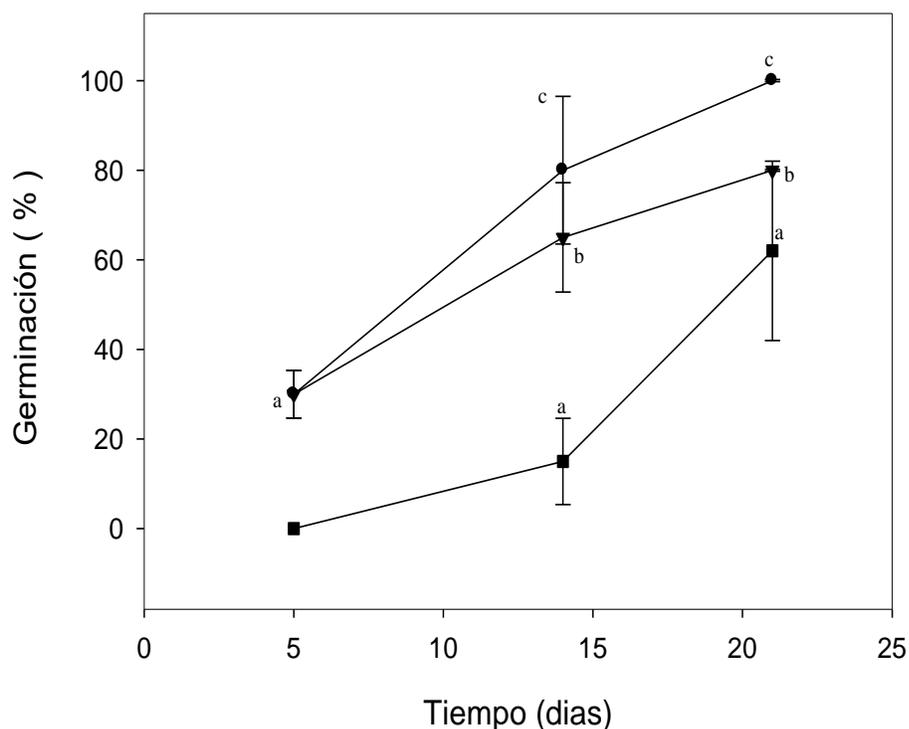


Figura 2. Porcentaje de germinación tres especies de leguminosas en medio de Murashige y Skoog sin hormonas.

Nota. Círculos, *Calopogonium* sp., triángulos, *S. capitata* y cuadrados, *C. moschata*. Las letras indican diferencias significativas entre las especies según la prueba de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). Cada valor es la media  $\pm$  ES (n=100). Fuente: Elaboración propia

Se encontraron diferencias significativas en la altura de las plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* de las tres especies en estudio, durante los 30 días de crecimiento en medio MS sin hormonas.

Las plantas *Calopogonium* sp., alcanzaron una altura de 8 cm, las de *C. moschata* 4-5 cm para y las de *S. capitata*, 6 cm. Se observó un aumento significativo en el crecimiento de la raíz principal, pivotante y ramificaciones de raíces finas laterales, en las tres especies. La raíz principal mostró longitudes de 12; 6 y 8 cm, en *Calopogonium* sp., (Figura 3), *C. moschata* (Figura 4) y *S. capitata* (Figura 5). Todas las especies mostraron cotiledones verdes, gran producción de pares de hojas y formación de raíces.

Se estableció un pequeño banco de germoplasma con las tres especies de leguminosas forrajeras.

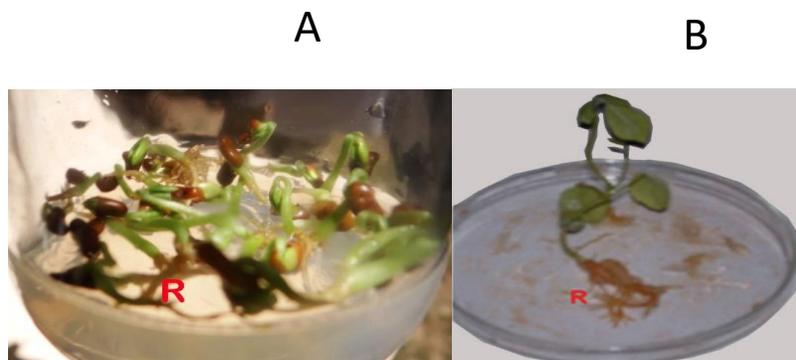


Figura 3. Germinación *in vitro* de semillas de *Calopogonium* sp., y plántula desarrollada.

Nota. R :raíces. Fuente: Elaboración propia



Figura 4. Etapas de germinación y crecimiento *in vitro* en *Cassia moschata* en medio de Murashige y Skoog sin hormonas.

Nota. A: 5 días y B: 21 días de cultivo. C: Cotiledones; r: radícula; R: raíces y H: primordios foliares. Fuente: Elaboración propia

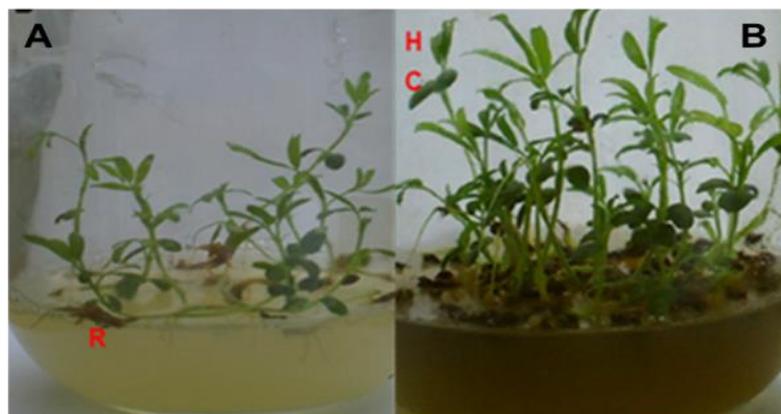


Figura 5. Etapas de germinación y crecimiento *in vitro* de *Stylosanthes capitata* en el medio de Murashige y Skoog sin hormonas.

Nota. A, 14 días y B, 21 días de cultivo. R, raíces; H, primordios foliares y C, cotiledones. Fuente: Elaboración propia

**Germinación con el método de cámara húmeda de las semillas de *Calopogonium* sp., *C. moschata* y *S. capitata*.**

En esta etapa los métodos de desinfección y escarificación química aplicados fueron los mismos que los usados para el método de germinación *in vitro* con medio de cultivo.

Para los días 5 y 14 de tratamiento no se reportaron evidencias de germinación para *C. moschata*, pero sí diferencias significativas entre los porcentajes de germinación las especies de *Calopogonium* sp., y *S. capitata*.

El porcentaje más alto a los 14 días, se observó en las semillas de *Calopogonium* sp (52%), valor que fue estadísticamente mayor que el de las semillas de *S. capitata* (35%). Para el día 21 de cultivo, *Calopogonium* sp., había alcanzado el 60% de germinación mientras que *S. capitata* mostró un 52% y *C. moschata* un 8% (Figura 5). Se encontraron diferencias significativas en el tiempo y entre tratamientos.

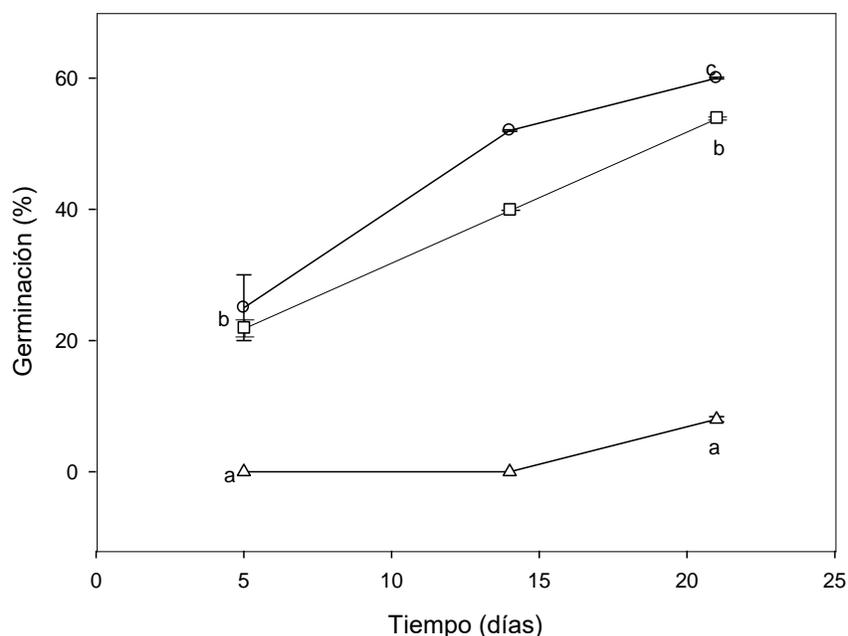


Figura 6. Porcentaje de germinación a lo largo del tiempo de las tres especies de leguminosas en cámara húmeda.

Nota. Círculos, *Calopogonium* sp.; cuadrados, *S. capitata* y triángulos, *C. moschata*. Las letras indican diferencias significativas entre las especies según la prueba de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). Cada valor es la media  $\pm$  ES (n=100). Fuente: Elaboración propia

Se encontraron diferencias en la altura de las plántulas de las tres especies en estudio durante los 30 días de crecimiento. Con una altura de 3 cm aproximadamente para *Calopogonium* sp., 1

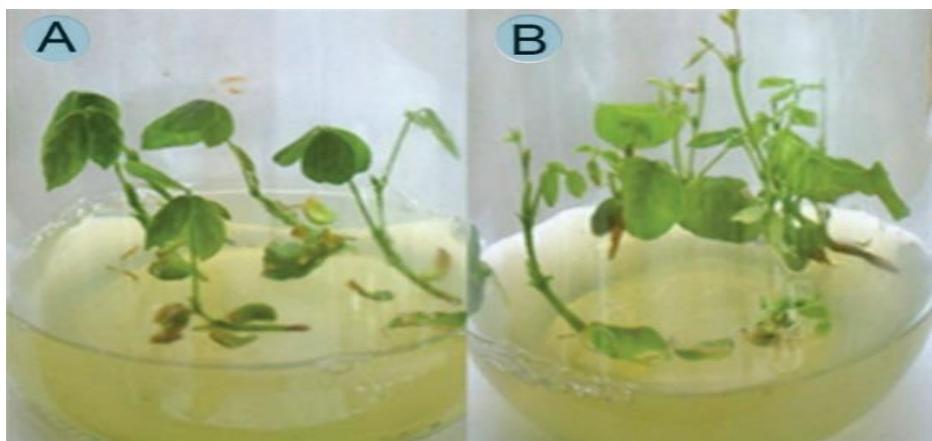
cm para *C. moschata* y para *S. capitata*. Se observó un aumento significativo en el crecimiento de la raíz principal pivotante, en *Calopogonium* pero no en *C. moschata* ni en *S. capitata*. No se observaron ramificaciones de raíces finas laterales y la raíz principal mostró longitudes de 1 hasta 5 cm, en las tres especies.

El papel de filtro esterilizado, que sirvió como soporte para el crecimiento de *C. moschata* mostró siempre oxidación. En algunas cápsulas se observó contaminación (hasta 25%), aun cuando estaban selladas con plástico (envoplast).

### **Multiplicación *in vitro* a partir de microesquejes.**

Una vez germinadas las semillas de las tres especies, de las plantas originadas, se aislaron microesquejes a partir de 2do nudo y se sembraron en medios de cultivos con diferentes concentraciones de BA y un medio MS sin hormonas (control), con el fin de aumentar el número de plantas (Tabla 4).

Los microesquejes de las tres especies sembrados en el medio de control MS (sin sustancia de crecimiento), continuaron su desarrollo y no presentaron formación de nuevos brotes (Tabla 4). Los microesquejes de *Calopogonium* sp., presentaron una altura promedio de 4,8 cm, formación de raíces con un promedio de 3 cm de largo, presencia de numerosas hojas verdes y con 2 a 3 nudos (Figura 7). Las plantas de *C. moschata* mostraron alturas de 2,5 cm, con producción de 2 pares de hojas y un nudo. No se observó formación de raíces hasta después de los 90 días de tratamiento (Figura 8). Los microesquejes de *S. capitata*, continuaron su desarrollo y no presentaron ninguna respuesta hacia la multiplicación (Figura 9).



*Figura 7.* Respuesta de los microesquejes de *Calopogonium* sp., cultivados en un medio MS sin reguladores de crecimiento.

*Nota.* A, desarrollo de la planta *in vitro* a las cuatro semanas y B, seis semanas de cultivo. Fuente: Elaboración propia



Figura 8. Respuesta de los microesquejes de *C. moschata* cultivados en un medio MS sin reguladores de crecimiento.

Nota. A, microesquejes de 2 cm en el medio de cultivo; B, desarrollo de la planta *in vitro* a las seis semanas de cultivo. Fuente: Elaboración propia

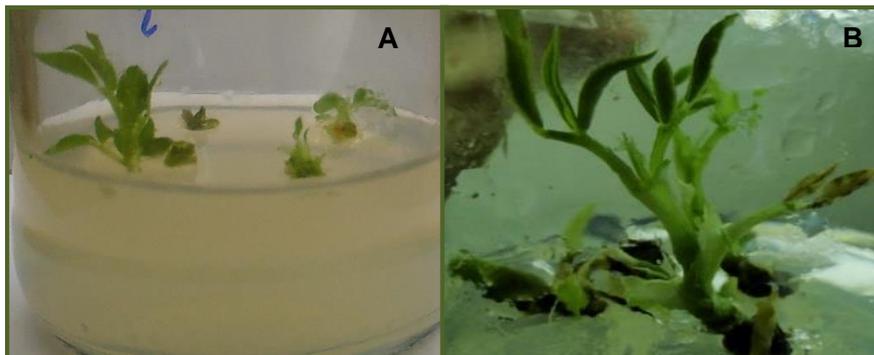


Figura 9. Respuesta de los microesquejes de *S. capitata* cultivados en un medio MS sin reguladores de crecimiento.

Nota. A, microesquejes de 2 cm en el medio de cultivo; B, desarrollo de la planta *in vitro* a las seis semanas de cultivo. Fuente: Elaboración propia

A los 60 días de cultivo, los microesquejes de *Calopogonium* sp., *C. moschata* y *S. capitata* mostraron diferencias significativas entre los medios de cultivo con BA en referencia a la multiplicación, distinguiéndose el mayor efecto en el medio MS3 (Tabla 4, Figuras 10 y 11). Este tratamiento afectó significativamente la producción de brotes/explante, presentándose los valores promedios más altos: 5; 1,66 y 7,5 para *Calopogonium* sp., *C. moschata* y *S. capitata*, respectivamente. Se observó que en los microesquejes de *Calopogonium* sp., y *C. moschata*, brotaron yemas presentes en los nudos, induciendo a numerosas ramificaciones sobre los cuales se originaron hojas verdes (Figuras 10 B y 11 B). A los 90 días de cultivo en MS3, los microesquejes de *Calopogonium* sp., mostraron un incremento significativo en la formación de yemas (2-3) y ramificaciones (3-4) con altura de 1 cm aproximadamente respecto a los microesquejes de *C. moschata* de 1 a 2 ramificaciones.

Los microesquejes de *Calopogonium* sp., creciendo por 60 días en MS3, mostraron aumento en el porcentaje la multiplicación (65%) y cambios morfológicos. En este medio de cultivo, se formaron callos de consistencia friable en la base de los tallos con coloración amarilla parduzca (Figura 12 A).

Los microesquejes de *S. capitata* expuestos a 60 días de cultivo en diferentes medios con BA, presentan el mayor porcentaje de multiplicación y la mayor cantidad de brotes por explante en el medio MS3. Adicionalmente se observó la formación de callos granulares de aspecto friable, color verde brillante y de gran tamaño hacia la base del tallo. Estos callos proliferaron cubriendo la totalidad de su superficie (Figura 12 B). En los explantes de *S. capitata* se encontró que la concentración más baja de BA en MS1, redujo significativamente la presencia de callos en la base del tallo.

Los microesquejes de *C. moschata* mostraron un incremento significativo en la respuesta positiva en el medio MS3, con respecto a los medios MS1, MS2 y MS (Tabla 4). Después de 60 días de cultivo en el medio MS3 también se observó en la base de los tallos la formación de callos de color marrón oscuro y estructura compacta; estos se oxidaron, posteriormente en algunos se necrosaron y murieron. Transcurrido 90 días no se observó modificación en el tamaño, forma y color de los callos, progresivamente se transfirieron a medios de cultivos frescos, pero no se observó formación de brotes.

Tabla 4

Efecto del regulador de crecimiento sobre la multiplicación *in vitro* a partir de microesquejes de *Calopogonium* sp., *C. moschata* y *S. capitata* durante 60 días tratamiento.

Medio de cultivo	Especies BA (mg L <sup>-1</sup> )	% multiplicación			brotes/explante		
		<i>Calopogonium</i>	<i>C. moschata</i>	<i>S. capitata</i>	<i>Calopogonium</i>	<i>C. moschata</i>	<i>S. capitata</i>
MS1	0,5	0a	0a	5a	0a	0a	2,5a
MS2	1	5b	0a	30b	2,3b	0a	4,7b
MS3	1,5	65c	30b	85c	5c	1,66b	7,5c
MS	control	0a	0a	0a	0a	0a	0a

Nota. Medias con letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Fuente: Elaboración propia

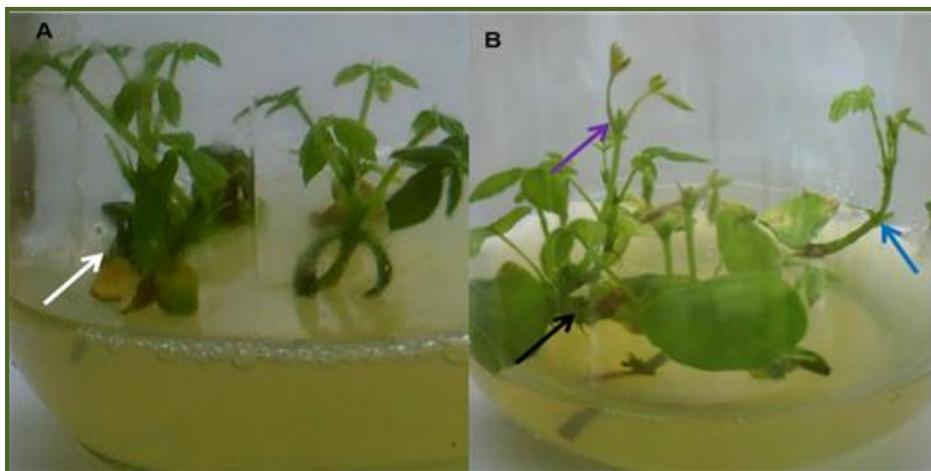


Figura 10. Multiplicación de *Calopogonium* sp., a partir de microesquejes en medio MS3.

Nota. Formación de brotes, A: 60 días de cultivo y B: 90 días. Flecha blanca: presencia de brote; flecha negra: brote en elongación; flechas morada y azul: nuevos brotes. La flecha negra, indica el sitio de formación de callo en la base del tallo de *S. capitata*. Fuente: Elaboración propia

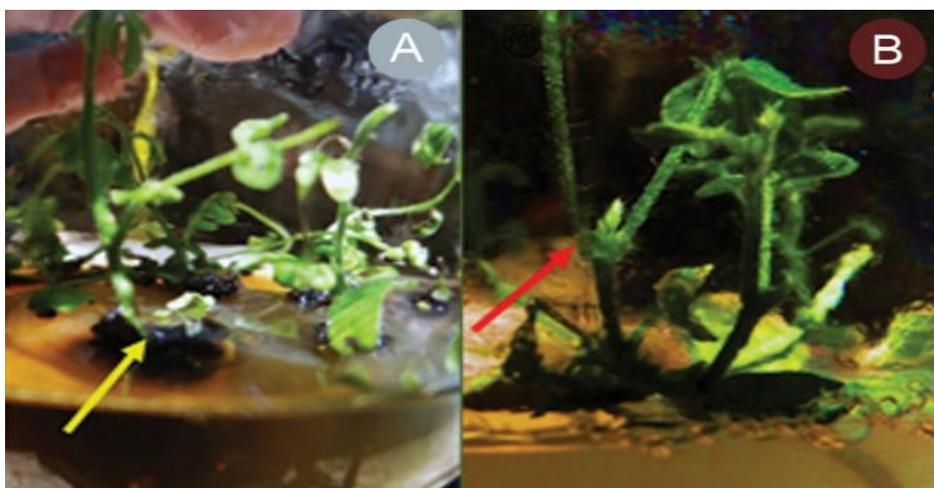


Figura 11. Multiplicación *C. moschata* a partir de microesquejes en medio MS3.

Nota. A: 60 días de cultivo, B: 90 días de cultivo. Flecha amarilla, tejido de callo oscuro en la base del microesqueje y flecha roja, brotes en un esqueje. Fuente: elaboración propia

Los microesquejes de *C. moschata* mostraron un incremento significativo en la respuesta positiva en el medio MS3, con respecto a los medios MS1, MS2 y MS (Tabla 4). Después de 60 días de cultivo en el medio MS3 también se observó en la base de los tallos la formación de callos de color marrón oscuro y estructura compacta; estos se oxidaron, posteriormente en algunos se necrosaron y murieron (Figura 11 B). Transcurrido 90 días no se observó modificación en el tamaño, forma y color de los callos.

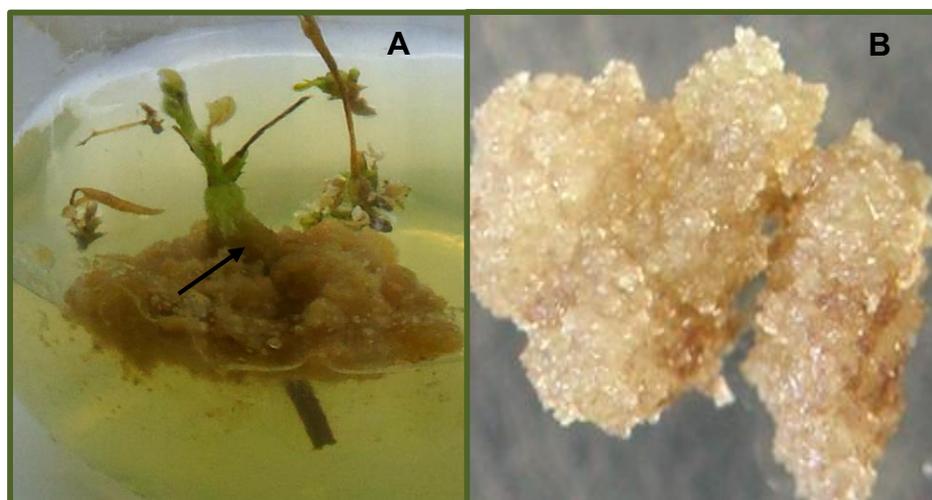


Figura 12. Tejido calloso formado en la base de microesquejes creciendo en medio MS3 a los 90 días de cultivo.

Nota. A: *Calopogonium* sp. y B: *S. capitata*. Nótese la diferencia en la coloración y estructura de los tejidos. La flecha negra, indica el sitio de formación. Fuente: Elaboración propia

## DISCUSIÓN

### Germinación in vitro de semillas de *Calopogonium* sp., *Cassia moschata* y *Stylosanthes capitata*.

Las leguminosas forrajeras en general ofrecen singulares ventajas para los sistemas de producción, debido a sus cualidades multipropósito, destacándose su capacidad de fijación de nitrógeno y mejoramiento en la fertilidad de los suelos. Sin embargo, estas plantas en su mayoría presentan ciertos problemas en su establecimiento en condiciones naturales, como consecuencia baja tasa de germinación debido a la dureza de la testa, pero la latencia puede ser revertida con la utilización de diferentes tipos de escarificación para hacerlas germinar (Faria *et al.* 1996).

Las semillas de plantas creciendo en el medio ambiente poseen en su superficie abundantes microorganismos, especialmente bacterias y hongos, que pueden afectar negativamente el crecimiento y desarrollo cuando se crecen in vitro. Por lo tanto, deben ser eliminados por medio de una desinfección superficial antes de que el material sea empleado. El hipoclorito de sodio es un desinfectante ampliamente empleado con éxito para la desinfección de semillas y otros explantes (De García *et al.*, 2005; Brucato, 2010). En esta investigación, el uso de una solución de hipoclorito de sodio al 3,5% fue adecuado en la desinfección de semillas de las tres especies en estudio. Aunque, en ocasiones se adicionó al medio de cultivo  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de cefatoxima para

inhibir el crecimiento de la flora bacteriana y cisteína para contrarrestar los compuestos fenólicos liberados por la semilla al medio de cultivo.

*Calopogonium* sp. En las semillas de *Calopogonium* sp., se observó un incremento en el porcentaje de germinación a los 14 días, cuando estas habían sido tratadas con etanol, indicando que hubo una ruptura del proceso de dormancia. El resultado obtenido tiene concordancia con lo reportado en semillas de *Stylozobium atterinum* por Rolston (1978); leguminosa empleada como abono verde. En semillas de árboles de la especie *Enterolobium cyclocarpum* escarificadas con etanol al 70% y desinfectadas con hipoclorito de sodio, se observó una reducción de la contaminación microbiana (hasta un 13%), y un incremento del 90% de germinación (Rodríguez et al., 2007). Nuestros resultados sugieren que la germinación de las semillas de *Calopogonium* sp. fue favorecida por el solvente orgánico y posiblemente por la disminución de agentes microbianos.

*Cassia moschata*. En las semillas de *C. moschata* que son de cubierta dura e impermeable al agua (Rojas-Rodríguez y Torres-Córdoba, 2015). En condiciones de campo se ha observado que demoran hasta 180 días para germinar (Buch et al., 1997). En nuestros ensayos, se observó que durante los 21 días de registro el porcentaje de germinación *in vitro* fue mayor cuando se incrementó el tiempo de inmersión en ácido sulfúrico concentrado, coincidiendo con reportes de que el ácido sulfúrico es considerado como una solución para la eliminación de la dormancia en semillas de esta especie (Sanabria et al., 2001 y Sanabria et al., 2004), y otras como *Centrosema macroparpum*, *C. brasilianum* y *Albizia lebbek* (Fariñas et al., 1997; Navarro et al., 2010).

El comportamiento de la semilla de *C. moschata* confirma su alta latencia y la potencialidad de la práctica de la escarificación con ácido sulfúrico, al favorecer la germinación de forma significativa en relación a los tratamientos sin inmersión. Sin embargo, en nuestro estudio, en el lapso del tiempo que fijamos para la observaciones, no encontramos para *C. moschata*, el rango apropiado para alcanzar un porcentaje de germinación significativo, lo cual posiblemente está relacionado con las características fisiológicas de la especie. Las semillas de *C. moschata* mostraron limitaciones para su establecimiento en los 10 días de iniciado el tratamiento, respuesta fisiológica que estuvo asociada con su fuerte latencia, baja viabilidad y lento crecimiento; por ser una especie arbórea, según lo reportado por Siddique y Anis (2007), quienes obtuvieron baja frecuencia de germinación *in vitro* con especies de *Cassia angustiflora*. No obstante, Agrawal y Sardar (2003) señalan que las especies de *Cassia* mejoran su condición germinativa con el uso de técnicas de propagación de cultivo de tejido, como se demuestra también en esta investigación.

*Stylosanthes capitata*. En condiciones de campo se ha reportado que la germinación de *S. capitata* generalmente ocurre a 90 días después de las lluvias, donde ha incrementado la micro fauna asociada de su ecosistema natural, contribuyendo con la ruptura de la testa. Sin embargo, si se trabaja en condiciones de invernadero es necesario aplicar escarificación química para romper la dormancia y suplir el trabajo de la biota (Almeida et al., 1979). En semillas de *Stylosanthes macrocephala* y *S. capitata* en condiciones de laboratorio se aplicó una sumersión con ácido sulfúrico al 40% durante 10, 15 y 20 min, y se observó a los 20 días de tratamiento que el mayor porcentaje de germinación se alcanzó con el tratamiento de 20 minutos. De acuerdo con Carmona et al. (1986) la germinación se favorece con el aumento del tiempo de exposición de las semillas a la acción del ácido. Asimismo, semillas de *Leucaena leucocephala*, *Centrosema pubescens*, *Clitoria ternatea*, *Stylosanthes saabiiti*, *Centrosema* sp., y *Leucaena* sp., mostraron los valores más altos de germinación en relación al testigo, cuando se utilizó ácido sulfúrico a diferentes concentraciones (Phipps 1982; Faria et al., 1996).

En nuestro trabajo, luego de escarificar las semillas de las tres especies, un grupo fue colocado en un medio de cultivo y otro en cámara húmeda, a fin de inducir el proceso de germinación. Se obtuvo que el porcentaje de germinación en medio de cultivo, incremento significativamente todas las variables de crecimiento evaluadas respecto a la germinación en cámara húmeda y estas diferencias fueron más evidentes a partir del día 14 de germinación. Los valores de crecimiento de las plantas provenientes de semillas germinadas en agua, sugieren que éstas estuvieron en condiciones con deficiencias nutricionales, con respecto a los valores reportados para plantas obtenidas por germinación *in vitro* en medios de cultivo de diferentes especies. Debido a este resultado, en nuestro estudio se descartó el uso de la germinación en cámara húmeda, aun cuando este podría ser una estrategia para aminorar los gastos ocasionados por el uso del medio MS.

En la presente investigación, en el medio MS se encontró que las plantas originadas de semillas germinadas *in vitro* de *S. capitata* y *C. moschata* desarrollaron tempranamente una raíz pivotante engrosada, ya sea compuesta por el hipocótilo o más frecuentemente por la raíz primaria y un incremento en las ramificaciones de raíces finas laterales. En plantas de *Calopogonium* sp. la raíz principal presentó una forma delgada muy larga y hubo un incremento de las raíces laterales, sugiriendo que el sistema favoreció su desarrollo, lo cual contribuiría a su establecimiento en tierra fértil. En plantas *in vitro* de *Stylosanthes guianensis* obtenidas bajo las mismas condiciones, se reportó un crecimiento significativo en la raíz principal y raíces laterales, la cual era de extrema importancia puesto que posteriormente iban a ser trasplantadas a suelos

infértiles y esto favorecería un aumento en la exploración del suelo y contribución a mejorar el estado nutricional de los mismos (Consoli et al., 1996; Fuentes y Pérez, 1990).

En nuestra investigación, las plantas obtenidas de la germinación de semillas *in vitro* mostraron un desarrollo significativo del sistema radicular, una vez que se prolongaba el tiempo en el medio de cultivo, lo cual podría estar asociada a la composición nutricional que contenía dicho medio de crecimiento. Contreras y Almeida (2003) reportaron que los mayores valores de crecimiento y longitud radical en *Cyphomandra betacea* estaban relacionados a un mejor estado nutricional proporcionado por el medio de cultivo *in vitro*. Esto promueve la rápida reproducción y multiplicación del material vegetal, obteniéndose finalmente plantas *in vitro* sanas con alta probabilidad de obtener material de siembra a lo largo de todo el año (no estar sujetos al ciclo estacional).

### **Multiplicación *in vitro* a partir de microesquejes**

#### ***Efecto de la concentración del BA, sobre el crecimiento de los microesquejes***

En general, las plantas pertenecientes a las Leguminosae son difíciles de regenerar mediante la propagación *in vitro* (Molina et al., 2005). Las tasas de multiplicación de brotes dependen del número de esquejes nodales que pueden ser escindidos de la sesión final de cada explante. Sin embargo, la multiplicación de los brotes de árboles leguminosos se ha logrado con la combinación de BA y ANA (Ácido naftalenacético), (Rey et al., 1985; Veraplakorn et al., 2012).

Las citoquininas se emplean asiduamente para estimular el crecimiento y el desarrollo, siendo la más utilizada el BA, que en concentraciones relativamente altas, puede promover la formación de brotes adventicios al reducir la dominancia apical (Castillo, 2004).

En nuestra investigación, los microesquejes de las especies de *Calopogonium* sp, *C. moschata* y *S. capitata* cultivados en el medio MS sin hormonas, no mostraron respuesta hacia la multiplicación y continuaron su desarrollo, sin observarse la formación de estructura de novo. Este resultado puede explicarse debido a que en el medio de cultivo hay ausencia de sustancias reguladoras del crecimiento, principales inductores de la proliferación de los explantes. Las plantas *in vitro* originadas en este medio, generalmente se limitan a aumentar su masa, volumen y desarrollar su sistema radicular. Como lo observado en plantas *in vitro* de *Enterolobium cyclocarpum* cultivadas en medios de sales de MS que mostraron un incremento en la altura e iniciación de raíces principales (Rodríguez-Sahagún et al. 2007).

El cultivo de microesquejes de *Calopogonium* sp., *C. moschata* y *S. capitata* en medio MS3 (1,5 mg L<sup>-1</sup> de BA), resultó exitoso para el efecto de la multiplicación, presentando los mayores valores de porcentajes de multiplicación (65%,30% y 85% respectivamente) y promedios de

brotos por explante, en el MS que no tenía BA no se dio la multiplicación. La inducción, crecimiento, desarrollo y proliferación de brotes son por lo general, procesos promovidos por la incorporación de reguladores de crecimiento al medio de cultivo; comúnmente las citocininas que suprimen la dominancia del meristemo apical promueven la formación de brotes axilares (Martínez y Pacheco, 2006; Segura, 2008).

Nuestros resultados con *S. capitata* difieren de los obtenidos por Pérez et al. 2006 quienes trabajando con *S. humilis* observaron que a la concentración de  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  no inducía multiplicación *in vitro*, probablemente debido lo cual podría indicar que el requisito de BA, debe estar asociado a la variedad utilizada. Esto apoya los estudios que señalan que el proceso de propagación *in vitro* es particular para cada especie vegetal e inclusive para variedades o cultivares dentro de una misma especie, y zonas dentro una misma planta (Ishikawa y Evans 1995). También son interesantes los resultados Parveen y Shahzad (2011), quienes trabajaron con concentraciones más bajas que las utilizadas a la presente investigación, ellos reportaron que segmentos de tallos *Cassia angustifolia* sembrados en un medio de cultivo MS suplementado con una concentración de BA  $2,5 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ , presentaron una alta frecuencia de regeneración de yemas (90%) y un máximo de 42,76 brotes/explante, comparado con ensayos realizados con concentraciones menores ( $1 \times 10^{-4}$ ;  $5 \times 10^{-4}$ ;  $1 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ ); los micro-tallos obtenidos se alargaron y fueron enraizados con éxito.

En explantes (nudos y brotes) de *Cassia siamea* Lam, *C. fistula*, *C. Linn obtusifolia* L Syn, *C. tora* cultivados en medios de iniciación (gama de auxinas y/o BA desde  $1 \times 10^{-3}$  hasta  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ) para la micropropagación y regeneración de dichas especies, se evidenció una alta proliferación de plantas *in vitro*, en los medios que se habían empleado BA a concentraciones de  $5 \times 10^{-4}$  a  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ , sin combinación de otros reguladores de crecimiento (Anis et al. 2012).

Agrawal y Sardar (2003), encontraron en plantas propagadas *in vitro* de *Cassia* sp., que al aumentar las concentraciones de BA hasta  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  había una tendencia a la disminución del porcentaje de explantes respondiendo al proceso de multiplicación, y del número promedio de brotes por explante. Lo que sugiere, que las concentraciones endógenas de citocininas aunado a la exógena causaron una inhibición en el desarrollo de los brotes y la supervivencia de los mismos.

Nuestros resultados concuerdan con lo encontrado por Júnior et al. (2004), quien trabajó con segmentos nodales de acacia negra cultivados en tres medios de MS enriquecidos con BA ( $1$ ;  $2$ ;  $3 \text{ mg L}^{-1}$ ), mostraron la mayor tasa de multiplicación de las yemas ( $2,5$  brotes/explante), a la concentración de  $3 \text{ mg L}^{-1}$ .

Los resultados aquí presentados sugieren que las especies aquí analizadas requieren de concentraciones de BA, relativamente altas en comparación con otras variedades o cultivares de la misma especie de la familia de las leguminosas.

## CONCLUSIONES

En esta investigación observamos que el uso de una solución de hipoclorito de sodio al 3,5 % es adecuado en la desinfección de semillas de las tres especies en estudio, en ocasiones se adicionó al medio de cultivo 100 mg L<sup>-1</sup> de cefatoxima para inhibir el crecimiento de la flora bacteriana y cisteína para contrarrestar los compuestos fenólicos liberados al medio de cultivo.

En relación a la escarificación, fue suficiente usar solo etanol al 70% en el caso de las semillas de *Calopogonium* sp., y con ácido sulfúrico en semillas de *Cassia moschata* (98%) y de *Stylosanthes capitata* (48%), facilitó al embrión inmaduro la ruptura de la testa, y por lo cual presentaron una alta respuesta de germinación.

Las semillas escarificadas se sometieron a dos métodos para obtener la germinación: en medio de cultivo MS (1962) y en cámara húmeda resultando más favorable la primera donde se obtuvo para el día 21 de cultivo, para *Calopogonium* sp., el 100% de germinación, para *S. capitata* mostró 85% y *C. moschata* un 65%.

Las plántulas obtenidas de la germinación de las semillas se usaron como fuente microesquejes para la propagación clonal de las tres especies en estudio. La presencia de BA en el medio de cultivo fue un factor determinante para la multiplicación de los microesquejes. La concentración de 1,5 mg L<sup>-1</sup> BA, incrementó significativamente los valores del porcentaje de multiplicación, para *Calopogonium* sp., (65%), *C. moschata*, (30%) y *S. capitata*, (85%).

Se observó adicionalmente una repuesta morfogénica en la base de los explantes en medios con 1,0 mg L<sup>-1</sup> BA, manifestada por la formación de callos, los cuales en el caso de *S. capitata* eran de naturaleza organogénica, ya que presentaban meristemoides en su sus tejidos. Estos tejidos serán producto de una investigación para determinar su potencial como generadoras de nuevas plantas.

Se estableció un protocolo para aumentar la producción de *Calopogonium* sp., *Cassia moschata* y de *Stylosanthes capitata*, especies de gran importancia en los ecosistemas de sabana, mediante el incremento de la capacidad germinativa de sus semillas y la posterior propagación masiva *in vitro* de microesquejes, obtenidos a partir de las plántulas producto de la germinación. El 90% de las vitroplantas se aclimatizaron exitosamente en las condiciones ambientales del vivero.

*Agradecimientos:* Las autoras agradecen al Fondo Nacional de Ciencias, Tecnología e Innovación de Venezuela por el financiamiento de esta investigación mediante el Proyecto N° PEII2012-819, en el marco de los Proyectos de Grupo ONCTI-PEII.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, V., Sardar, P.R. (2006). *In vitro* propagation of *Cassia angustifolia* through leaflet and cotyledon derived calli. *Biology Plant*, 50, 118–122.
- Almeida, L.D., de Maeda, J.A., Falivene, S.M.P. (1979). Efeitos de métodos de escarificação na germinação de sementes de cinco leguminosas forrageiras. *Bragantia*, Campinas, 38, 83-96.
- Alonso, J. (2011). Los sistemas silvopastoriles y su contribución al medio ambiente. *Revista Cubana de Ciencias Agrícola*, 45, 107-115.
- Anis, M., Aref, I.M., Siddique, I., Ahmed, M.R., Naz, R. (2012). Advances in micropropagation of a highly important *Cassia* species-A Review. INTECH Open Access Publisher.
- Bentsink, L., Koornneef, M. (2008). Seed dormancy and germination. *Arabidopsis Book*, 6, 1-19. <https://doi.org/10.1199/tab.0119>.
- Buch, M.S., Jara, L.F., Franco, E. (1997). Viabilidad de semillas pretratadas de *Caesalpinia velutina standl*; *Enterolobium cyclocarpum* (j) y *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. *Boletín Mejoramiento Genético y Semillas Forestales*, 16, 8-19.
- Brucato MG. (2010). *Estudio comparativo de diferentes sistemas de regeneración in vitro para el mastuerzo: Eficiencia y variabilidad genética*. TEG Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
- Carmona, R., Ferguson, J.E., De Souza Maia, M. (1986). Germinação de sementes em *Stylosanthes macrocephala* M.B. Ferr. et Sousa Costa E *Stylosanthes capitata* vog. in *Linnaea Revista Brasileira de Sementes*, 8, 19-27.
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: Una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo, Las Brujas, Uruguay. AR- VITRO. *Revista INIA Serie Actividades de Difusión*, 382, 1-8.
- Consoli, L., Vieira, M.L., Lopes de Souza, C. Jr., Garcia, A.A. (1996). Tissue culture effects on quantitative traits in *Stylosanthes guianensis* (Leguminosae). *Brazilian Journal of Genetics*, 19, 469-474.
- Contreras I., Almeida J. (2003). Micropropagación del tomate de árbol (*Cyphomandrabetacea* (Cav.) Sendtn. *Solanaceae* silvestre usada en la alimentación humana. *Revista Forestal Venezolana*, 47, 9-13.

- De García, E., Salazar, R., Vargas, E.T., Oropeza, M. (2005). Micropropagación y organogénesis de *Aster ericoides* "cultivar Monte Cassino". *Interciencia*, 30, 295-299.
- De Lima Méndez, N.A., Oropeza, M., Pérez, A., Trujillo, I.E. (2006). Análisis de la estabilidad genética de plantas de *Stylosanthes capitata* Vog., regeneradas *in vitro* utilizando marcadores RAPDs. *Agronomía Tropical* 56: 663-667. Buscar
- Dora, J. (2010). Generalidades sobre semillas: Producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 3, 74-85.
- Escandón, A.S., Ferreri, P., Facciuto, G., Soto, S., Hagiwara, J.C., Acevedo, A. (2003). Combinación de técnicas *in vitro* y *ex vitro* para la micropropagación de Santa Rita (Hibr.) una arbustiva de relevancia ornamental. *Revista de Investigación Agropecuaria*, 32, 111-112.
- Faria, J.M., García, L.A., González, B. (1996) Nota técnica: Métodos de escarificación en semillas de cuatro leguminosas forrajeras tropicales. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 13, 573-579.
- Fariñas, I.D., Sanabria, V., Silva-Acuña, R. (1997). Escarificación química de semillas de tres especies de *Centrosema* para las sabanas bien drenadas. *Zootecnia Tropical*, 15, 221-237.
- Fuentes, L., Pérez, Y. (1990). Aplicación de técnicas biotecnológicas en *Stylosanthes guianensis* (Aubl) Sw., leguminosa forrajera promisorio para suelos infértiles. *Pastos y Forrajes*, 28, 1-47.
- González, Y., Navarro, M. (2001). Efectos de tratamientos pre germinativos en la ruptura de la dormancia en las semillas de *Albicia lebbbeck*. *Pastos y Forrajes*, 24, 225-228.
- Hilhorst, H., Finch-Savage, W., Buitink, J., Bolingue, W., Leubner-Metzger, G. (2010). Dormancy in plant seeds. In: *Dormancy and Resistance in Harsh Environments*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 43-67.
- Ishikawa, H., Evans, M.L. (1995). Specialized zones of development in roots. *Plant Physiology*, 109, 725-727.
- Júnior, N.B., De Cássia, R., Martins-Coder, M.P. (2004). Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild). *Revista Árvore*, 28, 493-498.
- León, T., Altieri, A. (2010). Enseñanza, investigación y extensión agroecología. Vertientes del pensamiento agroecológico. Fundamentos y aplicaciones. Instituto de Estudios Ambientales, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. Colombia 11-52.

- Marinucci, L., Ruscitti, M.A., Bedini, W. (2004). Morfogénesis *in vitro* de leguminosas forestales nativas de la República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía*, la Plata, 105, 27-36.
- Martínez, M.A., Pacheco, J.C. (2006). Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker. *Agronomía Colombiana*, 24, 207-213.
- Molina, M., Mahecha, L., Medina, M. (2005). Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18, 162-175.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15, 473-497.
- Navarro, M., Febles, G., Torres, V., Noda, A. (2010). Efecto de escarificación húmeda y seca en la capacidad germinativa de las semillas de *Albizia lebbbeck* (L.) Benth. *Pastos y Forrajes*, 33, 1-11.
- Parveen, S., Shahzad, AnWar. (2011). A micropropagation protocol for *Cassia angustifolia* Vall from root explants. *Acta Physiology Plant*, 33, 789-796.
- Pérez, A., Trujillo, I., Vidal, M., De lima, N. (2006). Micropropagación acelerada de *Stylosanthes humilis* una especie de gran potencial forrajero. *Acta Botanica Venezuelica*, 29, 345-356.
- Phipps, R. (1982). Methods of increasing the germination percentage of some tropical legumes. En: *Resume analítico sobre pastos tropicales*. CIAT. Vol IV, N° 3.
- Pierik, R. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, p. 330.
- Rey, H.Y., Bovo, O.A., Mroginski L.A. (1985). Cultivo *in vitro* de tejidos de tres especies de *Stylosanthes* (Leguminosae) *Agronomía*, 5, 819-824.
- Rodríguez-Sahagún, A., Castellano, O.A., Acevedo, G.J. (2007). *In vitro* propagation of *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste) from nodal explants of axenic. *E-Gnosis*, 5, 1-14.
- Rojas-Rodríguez, F. y Torres-Córdoba, G. 2015. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Corralillo (*Cassia moschata* Kunth). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* (Costa Rica), 12 (29), 2215-2504.
- Rolston, M.P. (1978). Water impermeable seed dormancy. *Botanical Review*, 44, 36-96.
- Sanabria, V.D., Silva-Acuña, R., Oliveros, M., Barrios, R. (2001). Escarificación química y térmica de semillas subterráneas de *Centrosema rotundifolium*. *Bioagro*, 13, 117-124.

- Sanabria, D., Silva-Acuña, R., Oliveros, M., Manrique, U. (2004). Germinación de semillas de las leguminosas arbustivas forrajeras *Cratylia argentea* y *Cassia moschata* sometidas a inmersión de ácido sulfúrico. *Bioagro*, 16, 225-230.
- Segura, J. 2008. Citoquininas. Fundamentos de la fisiología vegetal. Barcelona (España): Editorial Mc Graw Hill Interamericana, pp. 421-443.
- Siddique, I., Anis, M. (2007). *In vitro* shoot multiplication and plantlet regeneration from nodal explants of *Cassia angustiflora* (Vahl): A medicinal plant. *Acta Physiology Plant*, 29, 233–238.
- Toro, M., Hernández, R.M. (2008). Desarrollo sustentable de sabanas bien drenadas. *Acta Biológica Venezuelica*, 28 (1), 1- 14.
- Trujillo, I. 2008. Biotecnología aplicada al desarrollo sustentable de sabanas. *Acta Biológica Venezuelica*, 28 (1), 45-56.
- Veraplakorn, V., Nakorn, M.N., Kaveeta, L., Suwanwong, S., Bennett, I.J. (2012). Variation and long term regenerative capacity of two important tropical forage legumes: Cavalcade (*Centrosema pascuorum* CV. Cavalcade) and Stylo 184. (*Stylosanthes guianensis* CIAT 184) *in vitro*. *African Journal of Biotechnology*, 11, 15843-15851.