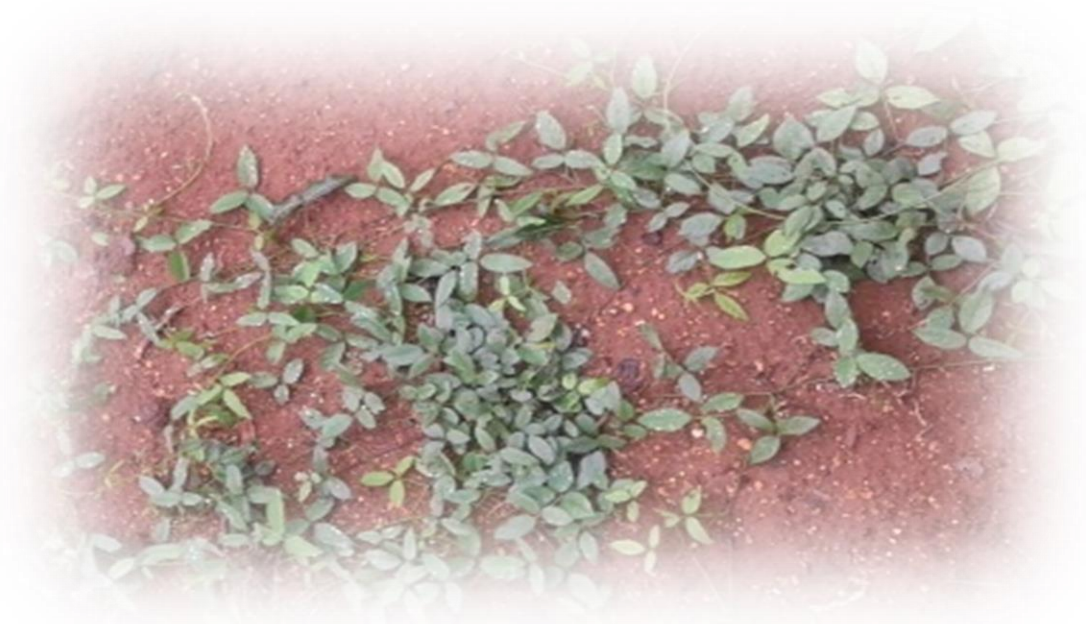


**Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez
Facultad de Ciencias Agropecuarias**

Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo



Título: Respuesta fisiológica de plántulas de *Teramnus labialis* (L.f.) Spreng, obtenidas de semillas escarificadas con nitrógeno líquido.

Autora: Liordanka Rodríguez Jauregui.

Tutor: M.Cs. Yanier Acosta Fernández.

Ciego de Ávila, 2019

Pensamiento.

“(…) el hombre transforma la naturaleza a medida que se desarrolla, a medida que crece su técnica; el hombre revoluciona la naturaleza, mas la naturaleza tiene sus leyes, y la naturaleza no se puede revolucionar impunemente. Y es necesario considerar esas leyes como un conjunto, es necesario e imprescindible y vital no olvidar ninguna de esas leyes”.

Fidel

Dedicatoria.

Este trabajo se lo dedico de todo corazón a mi familia y en especial a mi mamá, mi papá, mi abuela Elia y mi esposo quienes siempre me apoyaron y pusieron todo su amor y empeño para que pudiera llegar a ser profesional.

Agradecimiento.

Mis mayores agradecimientos son para mí tutor Chichi (Yanier Acosta) por su ayuda incondicional, paciencia, comprensión y por haber dedicado gran parte de su tiempo para la realización de este trabajo, siendo un ejemplo de profesor y tutor.

A Lianni quien contribuyó en la realización de este trabajo.

A toda mi familia de la que he recibido apoyo.

A mis amigos que siempre estuvieron a mí lado apoyándome en mis momentos de estrés, en especial a Betsy quien se convirtió en una persona muy importante durante mi etapa universitaria.

Resumen.

La siguiente investigación tuvo como objetivo evaluar la respuesta fisiológica y bioquímica en plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura, obtenidas de semillas escarificadas con nitrógeno líquido, las cuales se recolectaron en la finca La Esperanza ubicada en el municipio Ciro Redondo, provincia Ciego de Ávila, Cuba. Las semillas fueron introducidas en nitrógeno líquido durante 30 minutos como método de escarificación y luego se determinó el porcentaje de germinación, crecimiento, masa seca y masa fresca de las plántulas, proteínas, clorofila a y b, fenoles ligados a la pared celular y solubles, y malondialdehídos y otros aldehídos. Como principal resultado se obtuvo que la inmersión en nitrógeno líquido permitió los mejores porcentajes de germinación con un 91 %, resultando ser el tratamiento donde se alcanzó mayor crecimiento, masa fresca y seca. Los mejores contenidos de proteína total se encontraron en las hojas y tallos del tratamiento con nitrógeno líquido a los 14 y 28 días de germinadas las plántulas, las clorofilas a y b del tratamiento testigo mostraron mayor valor que las del tratamiento con nitrógeno líquido en las raíces a los 28 días con diferencia estadísticas entre ambos tratamientos, los fenoles ligados a la pared celular presentaron diferencia estadística en las raíces, tallos y hojas a los 14 días, mientras que los fenoles solubles mostraron diferencia entre los tratamientos a los 28 días en raíces y tallos.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Revisión bibliográfica	1
2.1 Generalidades de la Familia <i>Leguminosae</i>	1
2.2. Principales características de la especie <i>T. labialis</i> , cultivar Semilla Oscura.	1
2.3 La semilla	2
2.3.1 Tipos de semillas.	3
2.4 Germinación.....	4
2.4.1 Fases del proceso de germinación	5
2.5 Emergencia de las plántulas	5
2.6 Definición y clasificación de la dormancia en semillas	6
2.6.1 La dormancia física y sus métodos de ruptura en semillas de leguminosas.	7
2.7. Propiedades del nitrógeno líquido y la crioseguridad.	8
2.7.1 Influencia del nitrógeno líquido en la germinación de semillas de leguminosas	9
2.8 Estudios del germoplasma posterior a la crioconservación.	9
3 Materiales y Métodos	12
3.1 Recolección y almacenamiento de las semillas.....	12
3.2 Evaluación de la germinación y el crecimiento inicial en plántulas.....	12
3.2.1 Tratamiento de las semillas con nitrógeno líquido.	12
3.2.2 Germinación de las semillas.	12
3.2.2 Desarrollo de plántulas en bandejas	13
3.2.3 Determinaciones realizadas a las plántulas.	13
3.3 Evaluación de la respuesta fisiológica y bioquímica en plántulas.....	13
3.3.1 Determinaciones realizadas a las plántulas	13
3.4 Procesamiento Estadístico.	17
4. Resultados y discusión.	18
4.1 Evaluación de la germinación y el crecimiento inicial en plántulas.	18
4.1.1 Germinación de las semillas.	18
4.1.2 Tamaño de las plántulas, masa fresca y masa seca.	19
4.2 Evaluación de la respuesta fisiológica y bioquímica en plántulas.....	21
4.2.1 Contenido de proteínas.	21
4.2.2 Contenido de Clorofila a y b.....	23
4.2.3 Contenido de fenoles (ligados a la pared celular y soluble)	28
4.2.4 Contenido de malondialdehído y otros aldehídos.	30

5. Conclusiones.....	33
6. Recomendaciones.....	34
7. Revisión bibliográfica.	35

1. Introducción.

Entre las especies de plantas forrajeras más utilizadas se encuentran las leguminosas, que se destacan no solo por su capacidad para mejorar la producción animal, sino también por el gran potencial que tienen para contribuir a la sostenibilidad de los sistemas integrados de producción agropecuaria. Poseen además la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico mediante la fijación simbiótica a través de bacterias llamadas *rhizobium* (Oliveira y Manhaes, 2003).

Dentro de la familia *Leguminosae*, el género *Teramnus*, posee varias especies, entre las que se destaca *Teramnus labialis*(L.f.) Spreng(Machado y Olivera, 2008). *T. labialis* se considera la planta forrajera más prometedora de Cuba (Skerman *et al.*, 1991), es una especie originaria de América tropical y está representada por varios ecotipos en Cuba, Jamaica, Haití, Barbados, Colombia, Paraguay, Brasil y Argentina (Menéndez, 1982). Es una leguminosa naturalizada en Cuba de la que se han separado dos variedades.; Semilla Clara y Semilla Oscura.

Esta es una de las especies más estudiadas en Cuba (Machado y Olivera, 2008) y se ha utilizado con diversos fines, tales como cobertura en diferentes tipos de frutales (Gutiérrez *et al.*, 2002; Fontes, 2007; Acosta, 2014) , en sistemas integrados de producción agropecuaria en el sector ganadero (Chamorro *et al.*, 1998; Oliveira y Manhaes, 2003), es además, una leguminosa muy apetecida por el ganado bovino y tiene un elevado contenido de proteína, que fluctúa entre 16-20% (Fontes, 2008).

El extenso germoplasma de leguminosas existente en Cuba confirma el criterio de las amplias posibilidades que presentan estas especies para crecer en los distintos suelos cubanos, a pesar de lo anterior, la obtención de material de propagación de leguminosas forrajeras resulta una práctica poco desarrollada en las áreas dedicadas a la multiplicación especializada de semillas en Cuba (Gómez *et al.*, 2002). Lo anterior, es debido, a que las leguminosas forrajeras, en su gran mayoría, producen semillas que presentan dormancia por impermeabilidad de la cubierta al agua y al aire, lo que dificulta en gran medida el establecimiento de las diferentes especies (Thompson *et al.*, 2003).

A pesar de las ventajas ecológicas que conlleva su presencia al limitar la deshidratación por las altas temperaturas, impedir daños fisiológicos al embrión y otras estructuras, y mitigar los daños mecánicos causados por los animales y los patógenos (Bewley y Black, 1994), este mecanismo constituye un impedimento en los planes de fomento agrícola debido a la desigualdad en la germinación y dificultad en la propagación. Esto evidencia la necesidad de realizar tratamientos a las semillas para incrementar su porcentaje de germinación (Laflin, 1995).

Investigadores y productores han desarrollado una serie de técnicas para hacer permeables las semillas con dormancia física, incluyendo, escarificación mecánica, ácido sulfúrico, enzimas, solventes orgánicos, altas presiones atmosféricas, agua caliente, almacenamiento en seco y bajas temperaturas. (Baskin and Baskin, 2014). La dormancia física, en varias especies se ha roto por congelación a temperaturas muy bajas, *Trifolium repens* y *Lotus corniculatus* (Eynard, 1958), *Medicago sativa* (Acharya *et al.*, 1999). En este sentido, Acosta *et al.*, (2012) lograron obtener altos porcentajes de germinación en semillas ortodoxas después de ser sometidas a un proceso de inmersión en nitrógeno líquido.

Son muchos los parámetros involucrados cuando se utiliza la inmersión en nitrógeno líquido de material vegetal y dentro de estos, las semillas. El contenido de humedad de las semillas, tamaño, anatomía y velocidad de enfriamiento (*cooling*) y recalentamiento (*rewarming*) son algunos elementos a tener en consideración (Engelmann y Takagi, 2000). Las semillas de mayor tamaño poseen una composición química rica en lípidos y velocidades de enfriamiento/recalentamiento inadecuadas, lo que puede afectar a la viabilidad de las semillas. Las semillas con mayor contenido en lípidos, parecen ser más susceptibles a la inmersión en nitrógeno líquido (Vertucci, 1989).

Una vez tratadas las semillas, es importante conocer, en semillas y plantas, elementos como, el contenido de azúcares, las proteínas los componentes de la membrana y el contenido hídrico de las semillas. Evaluar estos parámetros pueden ser indicadores efectivos para conocer la influencia del estrés causado por las bajas temperaturas en el desarrollo futuro de las nuevas plantas.

Problema: Se desconoce la respuesta fisiológica de plantas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura, obtenidas a partir de semillas escarificadas con nitrógeno líquido.

Hipótesis: El conocimiento de la respuesta fisiológica de plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura, permitirá demostrar la viabilidad del uso de este método de escarificación.

Objetivo General: Evaluar la respuesta morfo-fisiológica en plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura obtenidas a partir de semillas escarificadas con nitrógeno líquido.

Objetivos Específicos:

1. Evaluar la germinación y el crecimiento inicial en plántulas de *T. labialis* obtenidas de semillas escarificadas con nitrógeno líquido.
2. Evaluar la respuesta fisiológica y bioquímica en plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura obtenidas de semillas escarificadas con nitrógeno líquido.

2. Revisión bibliográfica

2.1 Generalidades de la Familia *Leguminosae*.

La familia de las leguminosas (*Leguminosae*) es una de las más numerosas dentro de las plantas que presentan flores. Esta taxonomía lo conforman 700 géneros y aproximadamente 20 000 especies y es una de las tres más amplias de las angiospermas (Doyle, 2013). Entre sus componentes específicos se pueden encontrar desde las formas arbóreas y arbustivas de constitución leñosa, hasta las formas herbáceas suculentas, dentro de estas últimas, desde las que poseen la particularidad de conformar cubiertas más o menos densas sobre el suelo hasta las que tienen la posibilidad de trepar y asociarse fuertemente con la vegetación circundante (Machado, 2004).

Esta familia presenta una distribución cosmopolita, incluyendo las zonas áridas, las montañosas, las sabanas, las tierras bajas e incluso en ecosistemas acuáticos. Muestra de lo expresado es que *Caesalpinioideae* prolifera principalmente en las sabanas tropicales, en los bosques de África, Sudamérica y Asia. *Mimosoideae* abunda en regiones tropicales y subtropicales semiáridas de África, Norteamérica, Sudamérica, y Australia y particularmente son numerosas en el hemisferio sur; mientras que *Faboideae* está distribuida en todo el mundo (Binder, 1997).

2.2. Principales características de la especie *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura.

La variedad menor (cultivar Semilla Oscura), como se le describe, presenta características como son: entrenudos de las ramas hasta 9 cm, foliolo central hasta 4 x 2,1 cm, con pelos muy pequeños aplicados en el haz y el envés, legumbres con algunos pelos aplicados, de 3,5-4 cm de longitud por 3 mm de ancho mucrón de 2 mm. Tiene de 6-9 semillas por legumbre de 2 mm y coloración pardo-oscura o negra. Inicia la producción de semillas primero que la variedad mayor y en mayo-junio las produce vanas al faltarle los nutrientes (Yepes, 1974). Es una variedad perenne, estolonífera, de tallos finos, que puede enraizar en los entrenudos. Estípulas de 3 mm flores blancas

diminutas en racimos axilares, con 2-3 por nudo. Cáliz de 4 mm peloso con 5 puntas iguales.

Taxonomía

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Fabales</i>
Familia	<i>Fabaceae</i>
Tribu	<i>Phaseoleae</i>
Género	<i>Teramnus</i>
Especie	<i>Teramnus labialis</i>
Nombre científico	<i>Teramnus labialis</i> (L.f.) Spreng
Cultivar	Semilla Oscura

T. labialis es una leguminosa de semilla pequeña, cuyo establecimiento se dificulta por poseer plántulas pequeñas (Yepes *et al.*, 1971). Sin embargo su establecimiento se realizó entre 6-8 meses en diferentes suelos, donde se empleó una densidad de 6 kg de semilla/ha distribuidas en líneas distanciadas a 50 cm entre sí y profundidad de 3-5 cm (Menéndez, 1982). Este establecimiento satisfactorio puede atribuirse a su habilidad para asociarse a diferentes plantas (Menéndez, 1982) y también a que nodula naturalmente, ya que esta pertenece a las leguminosas del grupo Cowpea (Norris, 1967) y la aparición de la nodulación tiene una alta relación con el desarrollo posterior a la germinación y su establecimiento (Sistachs y Frías, 1979). Para leguminosas de este tipo, Norris (1967) plantea que no es necesaria la inoculación, aunque es preferible y que tampoco requiere la peletización de las semillas, a no ser para la protección del *Rhizobium*.

2.3 La semilla

La semilla es el principal órgano reproductivo de la gran mayoría de las plantas superiores. Ésta desempeña una función fundamental en la renovación, persistencia y dispersión de las poblaciones de plantas, regeneración de los bosques y sucesión

ecológica (Rao *et al.*, 2007). Es una unidad reproductiva compleja, característica de las plantas vasculares, que se forma a partir del óvulo vegetal, generalmente después de la fertilización (Bewley *et al.*, 2013). La propagación por semillas es el método principal por el cual las plantas se reproducen en la naturaleza y uno de los métodos de propagación más eficaces y ampliamente utilizados para los cultivos. La semilla en sí, sin embargo, es el producto final de un proceso de crecimiento y desarrollo dentro de la planta madre.

2.3.1 Tipos de semillas.

Existen diferentes clasificaciones de las semillas, según la duración potencial de su viabilidad. De acuerdo con el laboratorio de semillas de la Universidad de Reading, Reino Unido, las semillas se clasifican en tres categorías: ortodoxas, recalcitrantes e intermedias.

Semillas ortodoxas

Las semillas se clasifican como ortodoxas o tolerantes a la desecación cuando son capaces de mantener su viabilidad cuando son desecadas hasta contenidos de humedad por debajo del 10% sin sufrir daños, (Chin y Roberts, 1980). Sus longevidades aumentan cuando disminuye el contenido de humedad y con la temperatura durante el almacenamiento, en una forma cuantificable y predecible.

Semillas recalcitrantes

Por el contrario, las semillas recalcitrantes o sensibles a la desecación pierden viabilidad cuando se desecan por debajo de un límite crítico, habitualmente entre 12-30 % de contenido en humedad (Chin y Roberts, 1980). Estas semillas no pueden resistir los efectos de la sequedad o temperaturas menores de 10° C; por tanto, no pueden ser conservadas por largos periodos al contrario de las semillas ortodoxas por que pueden perder su viabilidad.

Semillas intermedias

Existe una tercera categoría en la que las semillas tienen características de almacenamiento intermedias entre las ortodoxas y las recalcitrantes. Las semillas intermedias pueden ser desecadas a contenidos de humedad similares a los de las semillas ortodoxas. Sin embargo, las semillas, una vez desecadas, se dañan al someterlas a bajas temperaturas y su viabilidad desciende rápidamente durante el almacenamiento (Ellis *et al.*, 1990).

2.4 Germinación

La germinación se define como un conjunto de procesos que se inician con la captación de agua por la semilla y finalizan con la elongación de los ejes embrionarios y la penetración de la radícula por las estructuras que rodean al embrión (Bewley, 1997). Según Besnier, (1965) la aparición de la radícula a través de las cubiertas seminales es el primer indicio visible de la germinación. Según Bewley y Black, (1994) el clásico curso trifásico de la imbibición de las semillas refleja la rápida absorción inicial del agua por estas cuando están secas (fase 1). Posteriormente es seguido por un período de elongación asociado a la actividad enzimática y al incremento de las tasas de respiración y asimilación, lo cual se manifiesta en la utilización del alimento almacenado y su transportación a las zonas en crecimiento (fase 2). Finalmente ocurren sucesivas divisiones celulares que traen como consecuencia la aparición de la radícula y la plúmula (fase 3).

Puesto que el embrión debe crecer para que ocurra la emergencia, se requiere turgencia y extensión de la pared celular para la realización exitosa de la germinación. En muchas semillas los embriones están rodeados por tejidos que deben ser penetrados por la radícula (Besnier, 1965). Una vez que la semilla se embebió totalmente, la longitud de la fase 2 de la germinación se relaciona, probablemente, con la generación adicional de turgencia del embrión y su paso a través de la pared celular, o con el debilitamiento de los tejidos que se encuentran juntos a este (Welbaum *et al.*, 1998).

En la germinación epigea se hace visible un tallito alargado y luego ocurre el rápido alargamiento del hipocótilo, que trae como consecuencia la emergencia de los cotiledones y la plúmula (Welbaum *et al.*, 1998). Una vez emergidos los cotiledones, se

comienza a alargar la plúmula que hasta ese momento se desarrolló poco; de este alargamiento surge el futuro tallo.

2.4.1 Fases del proceso de germinación

Fase de Hidratación

La absorción de agua es el primer paso de la germinación, sin el cual el proceso no puede darse. Durante esta fase se produce una intensa absorción de agua por parte de los distintos tejidos que forman la semilla. Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria (Camacho, 1994).

Fase de germinación

Representa el verdadero proceso de la germinación. En ella se producen las transformaciones metabólicas, necesarias para el correcto desarrollo de la plántula. En esta fase la absorción de agua se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse (Camacho, 1994).

Fase de crecimiento

Es la última fase de la germinación y se asocia con la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible). Esta fase se caracteriza por que la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria (Camacho, 1994).

2.5 Emergencia de las plántulas

La emergencia de plántulas es el evento fenológico que más influye en el éxito de una plantación; esta representa el momento en el cual una plántula se hace independiente de las reservas seminales no renovables, originalmente producidas por sus progenitores, y cuando comienza el autotrofismo fotosintético (Nonogaki, 2006). El tiempo de emergencia muchas veces determina si una planta compite exitosamente con sus vecinos, si es consumida por los herbívoros, infestada por las enfermedades y si florece, se reproduce y madura al final de su etapa de crecimiento (Forcella *et al.*, 2000).

En condiciones de campo, la emergencia de plántulas está determinada por múltiples y complejas interacciones entre las condiciones ambientales, el suelo y las características intrínsecas de la semilla y de la plántula (Wang, 2005). Johnston *et al.*, (1997) y Nonogaki, (2006) señalaron que todas las semillas poseen sensores que detectan los cambios ambientales y así aseguran la germinación en condiciones favorables. Es por ello que Harper, (1977) aseveró que las condiciones ambientales que rodean directamente la semilla determinan la germinación y, por consecuencia, el éxito de la emergencia de plántulas y el establecimiento.

Dentro de los factores abióticos que intervienen directamente en el proceso germinativo se encuentran la luz, la temperatura y el agua, que a su vez tienen marcada connotación en la inducción de la dormancia, ya sea primaria o secundaria (Hilhorst y Bradford, 2000; Bradford, 2005; Bradford *et al.*, 2006).

2.6 Definición y clasificación de la dormancia en semillas

El término “semilla dormante” se refiere al estado en el cual las semillas intactas no germinan cuando se les brindan las condiciones que normalmente favorecen al proceso germinativo (Cohn, 2006) y estas pueden ser: humedad adecuada (agua), régimen apropiado de temperaturas, una atmósfera normal (oxígeno) y, en algunos casos, la luz (Hilhorst y Toorop, 1997).

La dormancia es una característica dependiente de la especie y el genotipo. Los factores ambientales pueden tener efectos significativos en la expresión fenotípica de la germinación y se conoce que estos interactúan con el genotipo (Foley y Fennimore, 1998; Geneve, 2003; Dias, 2005). Según Li y Foley, (1997) y Baskin y Baskin, (2005), la presencia de dormancia en las semillas actúa como modulador de la regeneración de las especies vegetales, además de convertirse durante la evolución de las plantas en una estrategia para evitar la germinación en las condiciones donde es probable que la supervivencia de la plántula sea baja. Por su parte, Matilla (2003) define dos principales tipos de dormancia: exógena (dormancia física, mecánica y química) y endógena (dormancia morfológica y fisiológica).

2.6.1 La dormancia física y sus métodos de ruptura en semillas de leguminosas.

La dormancia física es causada por una densa capa de células empalizadas, impregnadas con sustancias repelentes al agua, las cuales inhiben la imbibición (Baskin y Baskin, 1998) y ofrecen alta resistencia física para el crecimiento del embrión (Allen y Meyer, 1998; Alves *et al.*, 2004). Esto ocurre en aproximadamente 15 familias de plantas superiores que incluyen a *Leguminosae* (Morrison *et al.*, 1998; Baskin *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2005) y, de acuerdo con Kigel, (1995) y Baskin y Baskin (1998), es la forma más común de dormancia en árboles y arbustos de regiones tropicales.

Este tipo de dormancia y su eliminación o atenuación en condiciones naturales ha sido poco explicada, especialmente en regiones tropicales (Baskin y Baskin, 1998; Morrison *et al.*, 1998; Foley, 2001; Baskin *et al.*, 2006), si se compara con semillas que poseen dormancia fisiológica, como las de regiones mediterráneas y templadas, donde están relativamente bien estudiados los mecanismos subyacentes de la dormancia (Handley y Davy, 2005).

La escarificación es una técnica elemental para romper la dormancia de las semillas duras (Van Klinken *et al.*, 2006) de leguminosas arbóreas. Las cortezas seminales duras constituyen el medio para proteger las semillas contra ataques fúngicos y también de insectos, en condiciones de altas temperaturas y humedad (Leadem, 1997). El corte o la eliminación de una pequeña porción de la corteza en el extremo opuesto al embrión, con un instrumento filoso, puede ser eficaz cuando se realiza con cuidado, puesto que la semilla manipulada manualmente permite realizar el corte individual de acuerdo con el espesor de la cubierta seminal (Navarro, *et al.*; 2000). El uso de este método es frecuente, ya que virtualmente todas las semillas se pueden convertir en permeables y el riesgo sobre este tratamiento (daño) es pequeño, dado que se evita manipular en las cercanías de la región radicular (Poulsen y Stubsggard, 2000).

Aunque se han probado varios líquidos como un medio para romper la dormancia por cubierta dura, solo dos han sido ampliamente adaptados: el agua y el ácido (Navarro,

2002). El ácido utilizado para los pre-tratamientos es el sulfúrico (H_2SO_4), que causa algún tipo de combustión húmeda en la corteza seminal y es igualmente efectivo en leguminosas y en no leguminosas. Sin embargo, el método no es aplicable a las semillas que fácilmente se convierten en permeables, debido a que el ácido penetra y daña el embrión. La duración de este pre tratamiento debe tener como objetivo el alcance de un balance en el cual la corteza de la semilla (o pericarpio) sea suficientemente rota para permitir la imbibición, pero sin que el H_2SO_4 alcance al embrión (Teketay, 1996).

El agua caliente elimina la dormancia física en *Leguminosae* mediante el incremento de la presión, lo cual causa la ruptura de la capa macrosclereidal, o a través de la alteración del tapón estrofiolar (Dell, 1980). El método es más efectivo cuando las semillas se sumergen en agua caliente, o sea, no calentadas junto al agua, y cuando la inmersión es rápida, ya que evita los daños por calor en el embrión (Kannan *et al.*, 1996).

En ocasiones, el remojo en agua a temperatura ambiente incrementa la velocidad de germinación en semillas sin dormancia o con ligeros valores de esta; también se utiliza conjuntamente con un tratamiento más fuerte (CATIE, 2000). En ambos casos el efecto es la imbibición más rápida a partir del agua que rodea la semilla, si se compara con la que se puede lograr en una placa de Petri con un sustrato humedecido (prueba estándar de germinación) (Schmidt, 2000).

2.7. Propiedades del nitrógeno líquido y la crioseguridad.

El nitrógeno constituye el 80% del contenido gaseoso de la atmósfera; es inodoro, incoloro e insípido, por tanto no es perceptible por los sentidos humanos. Estando enfriado hasta su punto de ebullición ($-196^{\circ}C$) el nitrógeno puede ser condensado para formar nitrógeno líquido permaneciendo en este estado con tal que se mantenga a esta temperatura o por debajo de ella (Pritchard, 1995).

Al calentar el nitrógeno este frecuentemente se libera en forma de un vapor blanco contaminante que contiene agua congelada. Aun cuando el nitrógeno líquido no es tóxico, este tiene dos riesgos peligrosos para la vida: a) en la evaporación, el nitrógeno

desplaza el aire, creando una atmósfera que no permite vivir por la asfixia; b) el severo y extremo frío del nitrógeno líquido y sus vapores causan una congelación seria y quemaduras criogénicas. Es por ello que se hace necesario proveer informaciones básicas de seguridad sobre los peligros potenciales de maniobrar el nitrógeno líquido y los equipamientos criogénicos (Sakai, 1960).

2.7.1 Influencia del nitrógeno líquido en la germinación de semillas de leguminosas

Los resultados obtenidos en diferentes trabajos indican que el nitrógeno líquido puede utilizarse con semillas de numerosas plantas cultivadas (Cardoso *et al.*, 2000). El contenido de humedad de las semillas, su composición química y las velocidades de enfriamiento y recalentamiento son los factores que, habitualmente, se consideran determinantes del efecto de la crioconservación sobre las semillas (Stanwood, 1985). Las semillas de mayor tamaño, una composición química rica en lípidos o velocidades de enfriamiento-recalentamiento inadecuadas, pueden afectar la viabilidad de las mismas. Las semillas con mayor contenido en lípidos parecen ser más susceptibles a la crioconservación (Vertucci, 1989), aunque no está clara la existencia de una correlación entre la sensibilidad de las semillas a la crioconservación y su contenido en lípidos (Iriondo *et al.*, 1992).

Trabajos realizados destacan de positiva la respuesta germinativa que presentan diferentes especies de leguminosas frente a la crioconservación (Cardoso *et al.*, 2000). Estos autores plantean que antes de generalizar el uso de la crioconservación en semillas de leguminosas, debe evaluarse, en las diferentes especies y cultivares, el efecto de posibles alteraciones anatómicas sobre la viabilidad y vigor de las semillas.

2.8 Estudios del germoplasma posterior a la crioconservación.

Las técnicas de crioconservación existen para más de 100 especies vegetales. El empleo de nitrógeno líquido para la conservación a largo plazo expone el tejido a estrés físico, químico y fisiológico, lo que puede causar daños por las temperaturas ultra bajas (Harding, 2004). Aunque los efectos sobre el genoma es poco conocido, se plantea

que, en plantas regeneradas de material procedente del cultivo in vitro y posteriormente crioconservadas, cualquier acumulación de ADN polimórfico está inducido como resultado de un proceso completo de cultivo-crioconservación-regeneración y no de la crioconservación (Harding y Benson, 2001).

El análisis de la integridad genética de las plantas procedentes de materiales crioconservados, se realiza mediante diferentes técnicas, a nivel fenotípico, histológico, citológico, bioquímico y molecular; y existen diferentes técnicas de análisis (Harding, 2004). Por consiguiente, en los últimos años los científicos que se dedican al estudio de las diferentes técnicas de crioconservación sustentan sus resultados con el empleo de las técnicas de análisis.

Comprender cómo y por qué el germoplasma sobrevive o no en condiciones congeladas, se utiliza para comprender el proceso de crioconservación de plantas (Benson, 2008). Las yemas dormantes y los tejidos naturalmente aclimatados al frío, por ejemplo, sufren cambios estacionales en su metabolismo. Esta es una estrategia que se explota en la crioconservación (Sakai, 2004; Towill y Ellis, 2008).

La simulación de la aclimatación a temperaturas frías y notablemente templadas, en germoplasma de plantas tropicales también le confiere tolerancia al nitrógeno líquido (Chang y Reed, 2000; Sakai, 2004). Entender los complejos mecanismos que permiten la supervivencia a las temperaturas bajas en la naturaleza, pueden potencialmente asistir al reconocimiento del estado criogénico. Con este fin, los avances en bioinformática y tecnologías moleculares (Morrison *et al.*, 2006; Rubinet *et al.*, 2006; Keurentjes *et al.*, 2008) tienen un importante papel en las investigaciones que conducen al empleo de las técnicas de análisis en la respuesta del estrés (Thomashow, 1999, 2001; Xin, 2001; Sung *et al.*, 2003; Kaplan *et al.*, 2004; Gray y Heath, 2005; Hannah *et al.*, 2005; Renaut *et al.*, 2005, 2006; Yang *et al.*, 2005; Chinnusamy *et al.*, 2006; Van Buskirk y Thomashow, 2006).

Un ejemplo del empleo de estas investigaciones es la aplicación de la proteómica al estudio del almacenamiento de germoplasma de plantas recalcitrantes, particularmente con respecto a la preservación de meristemas de plantas de propagación vegetativa (Carpentier *et al.*, 2005, 2006, 2007; Vertommen *et al.*, 2007). Como resultado, esta

tecnología actualmente se emplea para examinar los efectos de la crioconservación y de tratamientos osmóticos en diferentes tipos de germoplasmas (Criel *et al.*, 2005; Carpentier *et al.*, 2006; Vertommen *et al.*, 2007).

En estudios realizados por (Dhanaraj *et al.*, 2007) para comprender los procesos relacionados con la tolerancia a la congelación se categorizan tres grupos de genes: los genes relacionados asociados con la tolerancia al estrés, los genes que codifican enzimas de la vía glicolítica y del ciclo de las pentosa-fosfato y los genes asociados con la síntesis de proteínas. Otros estudios relacionados con los radicales libres y sus intermediarios, brindan una aproximación para monitorear el estrés por temperaturas bajas (Benson y Bremner, 2004). El estrés oxidativo puede producirse en plantas y algas crioconservadas (Fleck *et al.*, 1999, 2000, 2003), lo que indica que las especies reactivas del oxígeno y los radicales libres modulan la tolerancia de los componentes relacionados con protocolos de crioconservación de plantas (Benson, 2008).

Los indicadores que se analizan en la tesis están relacionados con vías bioquímicas, fisiológicas y moleculares en la respuesta de los vegetales al estrés. Tales estudios brindan una imagen de los posibles efectos que ejerce la crioconservación en etapas tempranas de la germinación, el crecimiento y desarrollo de plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura.

3 Materiales y Métodos

3.1 Recolección y almacenamiento de las semillas.

En la presente investigación se utilizaron semillas y material vegetal obtenido de plantas de la especie, *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura. Las semillas utilizadas fueron recolectadas entre los meses de febrero - abril del año 2017 en la Finca “La Esperanza” del Municipio Ciro Redondo, provincia de Ciego de Ávila, Cuba, donde se encontraba un pequeño banco de germoplasma de esta especie de leguminosa forrajera y fue recolectado y tratado según lo establecido en el manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma (Rao *et al.*, 2007). Las semillas mostraron un contenido de humedad (en base a la masa fresca) de 7.54%, en el momento de la cosecha y se almacenaron durante un año en un frasco de cristal color ámbar a temperatura ambiente en la oscuridad.

3.2 Evaluación de la germinación y el crecimiento inicial en plántulas.

3.2.1 Tratamiento de las semillas con nitrógeno líquido.

Para el tratamiento de inmersión en nitrógeno líquido, las semillas se colocaron en crioviales y se introdujeron directamente en un tanque con nitrógeno líquido (velocidad de enfriamiento: $-200^{\circ}\text{C}/\text{min}$), donde permanecieron por un periodo de 30 minutos. Transcurrido el periodo de tiempo previsto para la inmersión en nitrógeno líquido, los crioviales se extrajeron del recipiente y se colocaron en una bandeja al aire libre hasta que las semillas alcanzaron el equilibrio con la temperatura ambiente, según lo descrito por (Acosta *et al.*, 2019). Todas las semillas fueron sembradas en bandejas para obtener el material vegetal necesario para hacerle las determinaciones.

3.2.2 Germinación de las semillas.

Se tomaron 100 semillas y se dividieron en 4 repeticiones de 25 semillas cada una y se colocaron en placas Petri (9 cm de diámetro), sobre un papel de filtro, previamente humedecido con 5 ml de agua destilada (ISTA, 2010). Posteriormente, las placas Petri,

se colocaron en una cámara pre-germinativa de ambiente controlado (Modelo: R-DTOP Series, China) y se mantuvieron a una temperatura de 30°C y con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad por un período de 24 días como recomienda (Martín, 2018). Se contabilizó el total de semillas germinadas, para cada tratamiento, a los 28 días y se expresaron los resultados en porcentaje (%) (Skerman *et al.*, 1991).

3.2.2 Desarrollo de plántulas en bandejas

El experimento se realizó en el laboratorio de Fisiología Vegetal ubicado en la Universidad Máximo Gómez Báez en Ciego de Ávila. Se tomaron 1300 semillas, para cada tratamiento y se pusieron a germinar en 8 bandejas de polietileno de 60 cm de largo y 30 cm de ancho, con 32 alvéolos de 7cm x 7cm y una profundidad de 9cm. Cuatro bandejas fueron utilizadas para el tratamiento con nitrógeno líquido y las otra cuatro para el tratamiento testigo. Las bandejas se rellenaron con un sustrato a base de suelo Ferralítico rojo típico (50%) y materia orgánica (50%) procedente del Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila. Se sembraron 10 semillas por cada alveolo a una profundidad de 2cm, para un total de 1200 semillas por tratamiento, a partir de lo recomendado por Machado (2004). Las bandejas se colocaron en una cámara pregerminativa de ambiente controlado a una temperatura de 30°C y un fotoperiodo de 12h luz y 12h oscuridad con riego en días alternos.

3.2.3 Determinaciones realizadas a las plántulas.

Se midió el tamaño de 10 plántulas, por cada tratamiento, a los 14 y 28 días de germinadas, midiendo con una regla graduada desde el extremo inferior (raíz) hasta el extremo superior (yema terminal). Fue determinada la masa fresca y masa seca de las 10 plantas por cada tratamiento a los 14 y 28 días.

3.3 Evaluación de la respuesta fisiológica y bioquímica en plántulas.

3.3.1 Determinaciones realizadas a las plántulas

Se tomaron 600 plantas, para cada tratamiento, a los 14 días y 600 plantas, para cada tratamiento, a los 28 días. Se dividieron las plantas en tres partes, hojas, tallos y raíces y se realizaron las siguientes determinaciones en el Laboratorio de Ingeniería Metabólica de Bioplantas:

➤ **Contenido de proteínas totales.**

El contenido de proteínas totales se determinó utilizando el método de Kjeldahl (AOAC, 1990).

Digestión.

Se colocó una muestra de 1 gramo en un tubo digestor junto con 10 g de catalizador, el cual consistió en una mezcla al 7% de $\text{SO}_4\text{Cu}:\text{SO}_4\text{K}_2$. Seguidamente, se añadieron 25 mL de H_2SO_4 concentrado y se procedió al calentamiento. Una vez que la solución se hubo aclarado, se prosiguió el calentamiento por otros 30 min, con lo cual se aseguró la completa oxidación de la materia orgánica. Se retiró y se dejó enfriar. Luego se agregaron 100 mL de agua.

Destilación.

Se preparó una solución de H_3BO_3 al 4% a la que se añadió una solución indicadora. Esta última se preparó con 0,02 g de rojo de metilo y 0,04 g de verde de bromocresol disueltos en 19 mL de alcohol y 1 mL de agua destilada. La proporción de solución indicadora fue de 5 mL por litro de H_3BO_3 al 4%. Se colocaron 50 mL de esta solución ácida preparada en un Erlenmeyer de 250 mL el que se situó a la salida del condensador para recoger el amonio destilado. Se añadió NaOH al 30% a la muestra digerida para liberar el amonio, hasta que la solución tomó una coloración azul intensa. Esta coloración se debe a la formación de un complejo entre iones amonio y cobre e indica que la cantidad de NaOH fue suficiente para neutralizar el exceso de H_2SO_4 .

La destilación se llevó a cabo hasta recoger aproximadamente 250 mL de líquido en el Erlenmeyer colector. A fin de determinar el amonio absorbido por el H_3BO_3 se tituló el destilado con HCl 0,1 N.

Valoración.

El destilado se valora con solución de H_2SO_4 0,2 N, hasta lograr el viraje de indicador Mortimer al color inicial rojo.

Cálculos.

Proteína total% = (V muestra- V blanco) x N ácido x 0.014 x F X100/g muestra

Siendo:

V muestra = ml de ácido gastados en la valoración de la muestra

V blanco = ml de ácidos gastados en la valoración del blanco.

0.014 = peso del meq del nitrógeno, en g.

F = es el factor de conversión de nitrógeno a proteínas (6,25).

g muestra= peso en g de la muestra.

➤ **Contenido de clorofilas a y b (Porra, (2002):**

Se adicionaron 0,5 mL de acetona 80% (v: v), las muestras se centrifugaron a 17 400xg a 4°C durante 15 minutos. Se colectó el sobrenadante y se midió la absorbancia a 647 nm y 664 nm. Las concentraciones de clorofilas se calcularon según las fórmulas:

$$\text{Clorofila a} = 12.25 * \text{Abs}_{664\text{nm}} - 2.55 * \text{Abs}_{647\text{nm}}$$

$$\text{Clorofila b} = 22.31 * \text{Abs}_{647\text{nm}} - 4.91 * \text{Abs}_{664\text{nm}}$$

$$\text{Clorofila a + b} = 17.76 * \text{Abs}_{647\text{nm}} + 7.34 * \text{Abs}_{664\text{nm}}$$

Los resultados se expresan en $\mu\text{g/g}^{-1}$ masa seca.

➤ **Contenido de fenoles (ligados a la pared celular y soluble):**

El contenido de fenoles se determinó por el método de (Gurr *et al*; 1992). Al material vegetal que previamente se maceró en nitrógeno líquido se le adicionó 500 μL de metanol. El homogenato se agitó con vortex y se centrifugó a 17 400xg, durante 15 minutos. El precipitado se sometió a dos ciclos adicionales de extracción con metanol, con 250 μL cada uno hasta completar 1,0 mL de extracto. El sobrenadante se colectó siempre y se consideró como la fracción de fenoles solubles.

El precipitado se incubó con 250 μL de hidróxido de sodio $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 16 horas a 70°C . Se adicionaron 250 μL de ácido clorhídrico ($2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) después de la incubación. Las muestras se centrifugaron a $17\,400\times g$, durante 15 minutos. El precipitado se descartó y el sobrenadante se colectó y se consideró la fracción enriquecida en fenoles ligados a las paredes celulares.

Para cuantificar los niveles de fenoles solubles y ligados a las paredes celulares, 20 μL de cada uno de los sobrenadantes se mezclaron con 980 μL de agua destilada. Se adicionaron 100 μL de reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu y las muestras se incubaron a temperatura ambiente (26°C) durante cinco minutos. Se adicionó 600 μL de bicarbonato de sodio (saturado con hidróxido de sodio $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). A los 60 minutos, se determinó la absorbancia a 725 nm en espectrofotómetro UV visible. La concentración de fenoles se expresó en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de masa seca, referidos a una curva patrón de ácido clorogénico ($\epsilon=0,00441 \mu\text{g}\cdot\text{mL}\cdot\text{cm}^{-1}$).

➤ **Contenido de malondialdehído y otros aldehídos:**

Se utilizó el procedimiento descrito por (Heath y Packer ,1968). El material vegetal se maceró previamente en nitrógeno líquido, se mezcló con 1,4 mL de agua destilada y se agitó brevemente. Se adicionaron 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,5% (m: v; en ácido tricloroacético 20% (v:v)) y las muestras se incubaron en un baño termostataado a 100°C durante 25 minutos. Luego se colocaron en baño de hielo durante cinco minutos y se centrifugaron a $800\times g$ durante 15 minutos. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 455, 532 y 600 nm en el espectrofotómetro UV visible. La absorbancia no específica del producto de la reacción (600 nm) se sustrajo de la absorbancia máxima a 532 nm para las mediciones de malondialdehído y de 455 nm para otros aldehídos.

Para calcular la concentración de malondialdehído se utilizó el coeficiente de extinción molar $155 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ y para otros aldehídos $45,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (promedio de los coeficientes de extinción del propanal, butanal, hexanal, y propanal-dimetilacetal) a 532 nm. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de masa seca.

3.4 Procesamiento Estadístico.

Para los experimentos de germinación se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, donde se establecieron cuatro repeticiones para cada tratamiento, en el caso de las mediciones a las plantas se tomaron diez plantas por tratamiento y en el caso de las determinaciones para conocer la respuesta fisiológica se tomaron aleatoriamente tres muestras por tratamiento. En el procesamiento estadístico de los datos se empleó el utilitario *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS para Windows, versión 23.0, Copyright SPSS Inc., 1989-1997). Se realizaron pruebas paramétricas (t-student), para una significación del 5 %.

4. Resultados y discusión.

4.1 Evaluación de la germinación y el crecimiento inicial en plántulas.

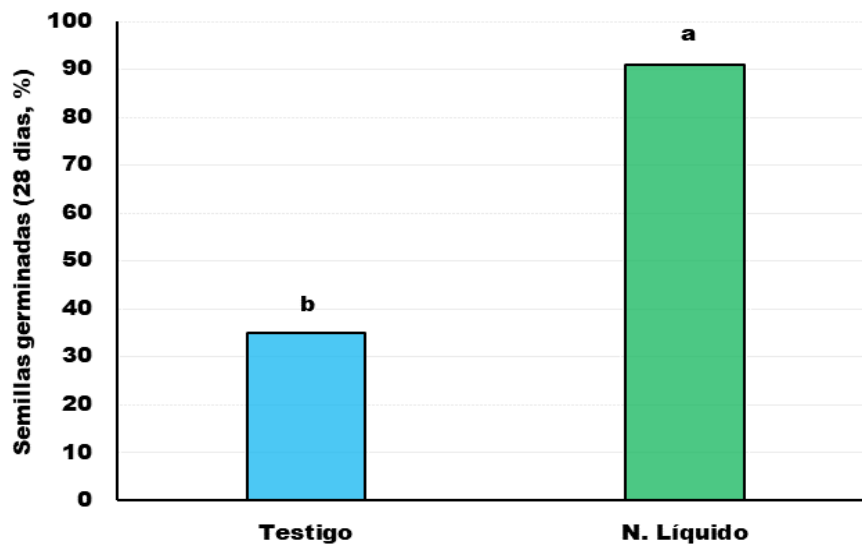
4.1.1 Germinación de las semillas.

Las semillas de las leguminosas se caracterizan por presentar, como principal mecanismo de dormancia, la impermeabilidad de sus cubiertas al agua y a los gases (Baskin and Baskin, 2014). Las cubiertas duras impiden la entrada de agua al embrión, por lo que es necesario realizar tratamientos de escarificación con el objetivo de permitir la entrada de agua y oxígeno al interior de las semillas. Uno de los tratamientos que se pueden realizar para romper esta dormancia es el uso de las bajas temperaturas (nitrógeno líquido, -196°C), aunque posterior al tratamiento de las semillas es importante estudiar el desarrollo de las nuevas plantas obtenidas (Baskin and Baskin, 2014)

En la Gráfica 1 se muestran los resultados obtenidos en el proceso de germinación de semillas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura. Se puede observar que la mejor respuesta germinativa corresponde al tratamiento de inmersión en nitrógeno líquido con un 91 % de semillas germinadas, encontrándose diferencias significativas respecto al tratamiento testigo (35 %). Los resultados obtenidos se deben a los cambios que se producen en la testa durante el proceso de congelación-descongelación, que derivan en el reblandecimiento de la misma y proporcionan un aumento en la entrada de agua al interior de la semilla, lo que permite que dé inicio el proceso de germinación.

En tal sentido, Acosta *et al.*, (2019) al realizar una microscopía por barrido electrónico en semillas de *T. labialis*, demostraron que el nitrógeno líquido ocasiona grietas en la testa de las semillas y concluyen, que, por medio de estas, el agua entra al interior de las semillas lo que favorece el proceso de germinación. Estos criterios concuerdan con los resultados obtenidos por García, (2012) al investigar diferentes tiempos de inmersión en nitrógeno líquido de semillas de *T. labialis*, y percibir un aumento en los porcentajes de germinación. Para Cejas *et al.* (2012), la inmersión en nitrógeno líquido de semillas ortodoxas y el consiguiente proceso de congelación-descongelación

garantizan una mejor respuesta germinativa, esta autora obtuvo resultados satisfactorios en trabajos realizados con semillas de *Phaseolus vulgaris* L.



Gráfica 1. Germinación total de semillas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura, a los 28 días. Medias con letras desiguales, significan diferencias estadísticas entre los tratamientos. (t -estudent; $p < 0.05$). E.E.=2.49.

4.1.2 Tamaño de las plántulas, masa fresca y masa seca.

El tamaño, masa fresca y masa seca de las plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura, muestra un aumento con el paso del tiempo (tabla1) observándose que las plántulas provenientes de las semillas escarificadas con nitrógeno líquido difieren estadísticamente del tratamiento testigo para cada uno de los parámetros evaluados. Se puede apreciar un aumento significativo del crecimiento en la última evaluación realizada a los 28 días, con respecto a los 14 días (figura 1). Este comportamiento de manera particular se debe a que las plántulas de este tratamiento emergieron con mayor rapidez.

Con respecto a los contenidos de materia fresca y materia seca, estos se encuentran relacionados con el tamaño de las plantas, por ende a mayor tamaño mayor contenido de masa fresca y seca en las plántulas. A los 14 días, los resultados en cuanto al contenido de materia fresca y materia seca alcanzados fueron mayores en el tratamiento con nitrógeno líquido con valores de 0.32g y 0.065g respectivamente, mostrando diferencias significativas respecto al tratamiento testigo. En tanto, a los 28

días de germinadas las plántulas alcanzaron contenidos de materia fresca y seca de 0.90g y 0.23g en el tratamiento con nitrógeno líquido con diferencias estadísticas respecto al tratamiento testigo.

Tabla 1. Tamaño, masa fresca y seca de plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura a los 14 y 28 días de germinadas.

Tratamiento	14 días			28 días		
	Tamaño	M. Fresca	M. Seca	Tamaño	M. Fresca	M. Seca
	(cm)	(g)	(g)	(cm)	(g)	(g)
Testigo	1.33	0.12567	0.02718	4.1	0.43763	0.11564
N. líquido	3.58	0.32998	0.06586	8.07	0.90531	0.23367
Sig.	*	*	*	*	*	*
E.E.	0.12	0.01	0.002	0.46	0.03	0.01

(*) significa diferencias estadísticas entre tratamientos en una misma columna, (t-student, $p < 0.05$, $n = 10$).



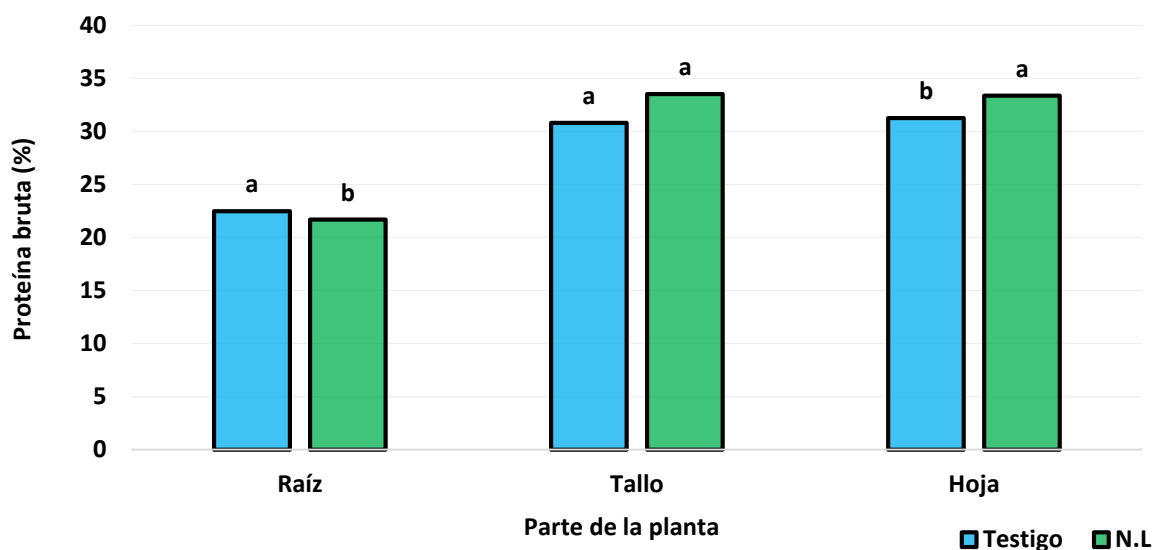
Figura 1. Crecimiento inicial en plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura, a los 14 y 28 días de germinadas.

En las evaluaciones realizadas se puede observar el tamaño pequeño de las plántulas obtenidas y las dificultades que presenta esta especie para su crecimiento en la

primera fase de su desarrollo. El comportamiento del crecimiento de las plántulas emergidas del tratamiento con nitrógeno líquido, demuestra la capacidad de establecerse con mayor rapidez debido al comportamiento precoz en cuanto a la emergencia, lo que garantiza que comience rápidamente los procesos de fotosíntesis y la absorción de nutrientes del suelo (Carvalho y Nakagawa, 2000). En los resultados obtenidos se muestra mayor crecimiento y desarrollo en plántulas provenientes de semillas escarificadas con nitrógeno líquido, lo que coincide con Sanabria *et al.*, (2004), quienes obtuvieron un crecimiento más acelerado en semillas de *Cratylia argentea* y *Cassia moschata* después de someterlas a un proceso de escarificación, lo que garantizó que las semillas germinaran rápidamente y alcanzaran una mayor altura con respecto a un tratamiento testigo.

4.2 Evaluación de la respuesta fisiológica y bioquímica en plántulas.

4.2.1 Contenido de proteínas.

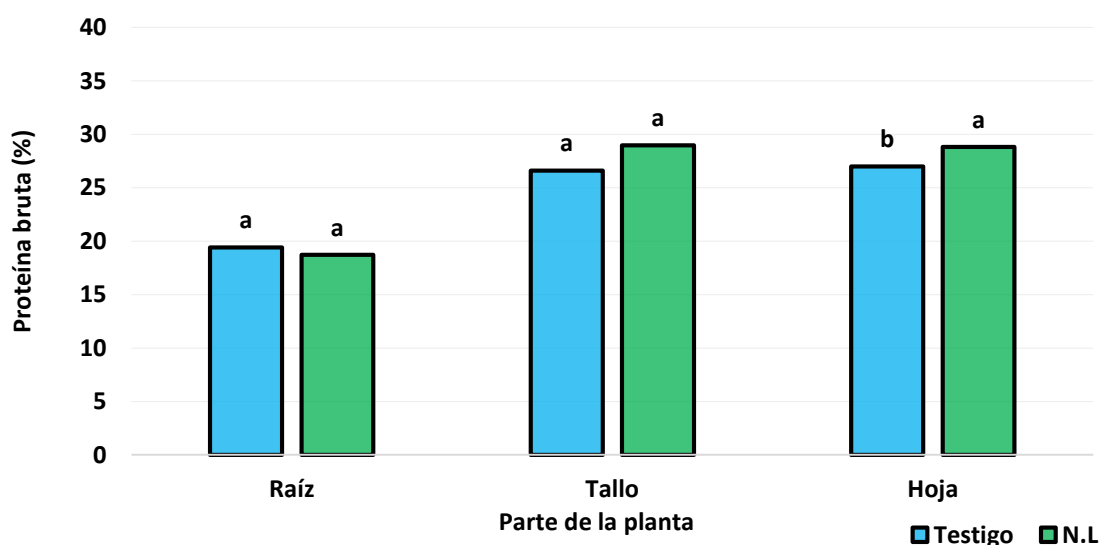


Gráfica 2. Contenido de proteína total en raíz, tallo y hojas de plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura a los 14 días de germinadas. Medias con letras desiguales, significan diferencias estadísticas entre los tratamientos de un mismo órgano de la plántula. (t -student; $p < 0.05$). E.E.=1.65, E.E.=2.21, E.E.=2.84.

El contenido de proteínas total en las raíces, tallos y hojas de plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura a los 14 días de germinadas se muestra en la figura 2. En la misma se puede observar que en la raíz se aprecia diferencia significativa entre ambos tratamientos, mostrándose en el tratamiento testigo más contenido de proteína total

que el tratamiento con nitrógeno líquido. Por otro lado los tallos obtuvieron mayores valores en el tratamiento con nitrógeno líquido, al igual que las hojas, con diferencias significativas entre ambos tratamientos en las hojas.

El contenido de proteína total en raíz, tallo y hojas de plántulas obtenidas a partir de semillas escarificadas con nitrógeno líquido en la especie *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura, a los 28 días de germinadas, se muestran en la gráfica 3. Para la raíz no existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados, aunque el mayor contenido de proteínas se obtiene para el tratamiento testigo con un 21%. En el caso del tallo (32%) y las hojas (32%), del tratamiento con nitrógeno líquido se alcanzaron mayores valores respecto al tratamiento testigo obteniéndose diferencia significativa en las hojas. Los mayores contenidos de proteína total se evidenciaron en los tallos y hojas, mientras que en la raíz estos contenidos fueron inferiores, tanto a los 14, como a los 28 días.



Gráfica 3. Contenido de proteína total en raíz, tallo y hojas de plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura a los 28 días de germinadas. Medias con letras desiguales, significan diferencias estadísticas entre los tratamientos de un mismo órgano de la plántula. (t -student; $p < 0.05$). E.E.=1.14, E.E.=2.06, E.E.=2.13.

Diferentes estudios bioquímicos y genéticos suponen la inclusión de la fosforilación reversible de proteínas en la regulación de la respuesta de las plantas al estrés, frente a varios estímulos ambientales (Rock *et al.*, 2010). Tanto el estrés biótico como el abiótico (bajas temperaturas) pueden promover la síntesis de algunas proteínas e inhibir otras; sin embargo, autores como Ericson y Alfinito (1984), Palma (2002) y Forni

et al.,(2010) plantean que existe una tendencia general a la disminución de las mismas. En el experimento que se analiza, el efecto de la crioconservación de las semillas tuvo respuestas variables en el contenido de proteínas de los diferentes órganos y momentos experimentales, lo que está en correspondencia con lo que plantean Forni *et al.*, (2010), estas moléculas pueden sintetizarse o inhibirse como respuesta a señales externas que se dan a nivel de ARNm.

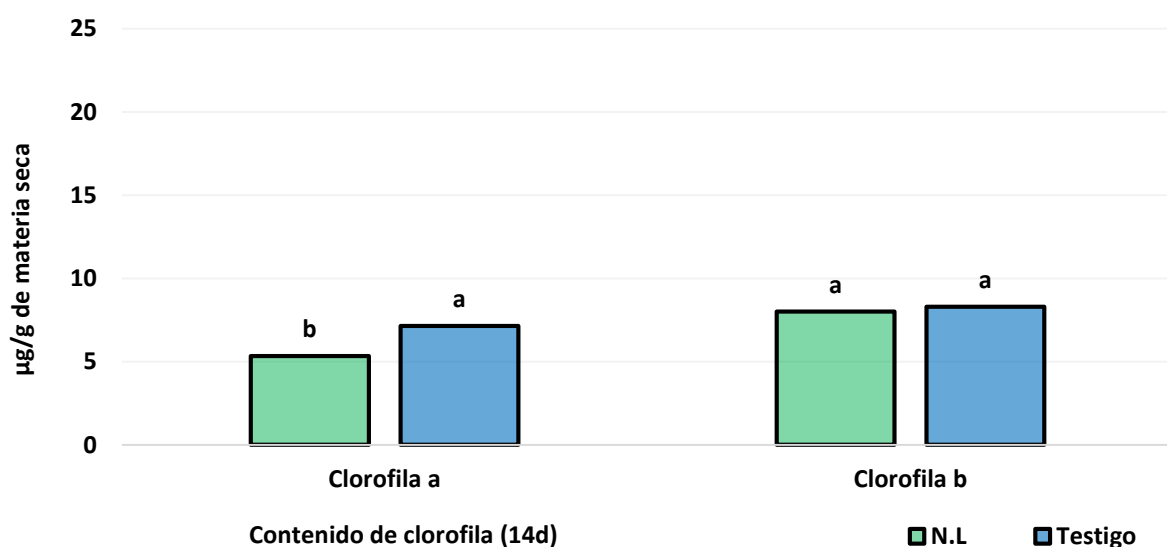
Existe información sobre cambios en niveles de algunas proteínas específicas producto del estrés por bajas temperaturas. Forni *et al.*, (2010), detectan variaciones significativas en la expresión de proteínas e identifican seis proteínas relacionadas con la respuesta al estrés o involucradas en el ciclo celular durante la crioconservación de brotes de manzana procedentes del cultivo de tejidos. Estos autores relacionan el contenido de proteínas con la criotolerancia a través de cambios que se producen en el metabolismo y en la expresión de proteínas durante este proceso.

Martínez-Montero *et al.*, (2002) encontraron altos niveles en el contenido de proteínas en la fracción microsomal de callos de caña de azúcar crioconservados durante los tres primeros días después de la descongelación, y lo relacionan con la inducción de diferentes genes que se expresan durante la exposición a las bajas temperaturas y la deshidratación de diferentes especies de plantas. La inducción de estos genes participa en numerosos procesos de protección de la membrana celular contra el estrés (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Shinozaki *et al.*, 2003), a través de la producción de proteínas importantes. También Svensson *et al.*, (2002) encuentran proteínas que responden a las bajas temperaturas, las cuales están dentro del grupo de las dehidrinas asociadas al sistema de endomembranas del citoplasma.

Sin embargo, Hamid *et al.*,(2010) observan una disminución en el contenido de proteínas en *Phaseolus vulgaris* L. producto del estrés por metales pesados. Costa y Spitz , (1997) y Mohan y Hosetti , (1997), por su parte informan sobre la disminución en el contenido de proteínas en otros cultivos producto del estrés abiótico.

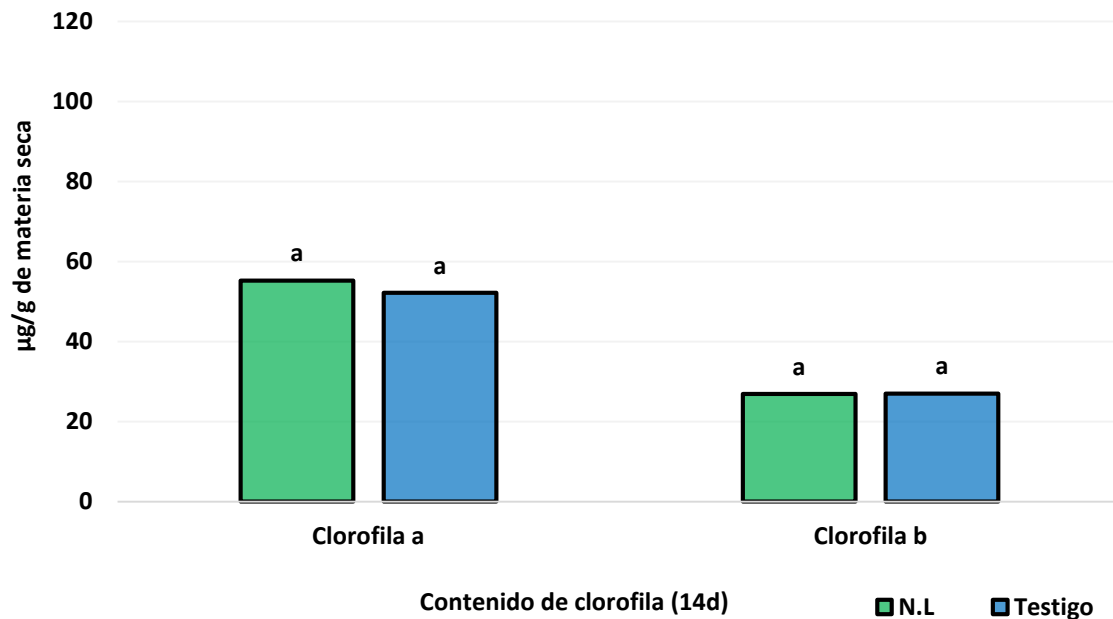
4.2.2 Contenido de Clorofila a y b.

La raíz de plántulas de la especie *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura, con 14 días de germinadas se muestra en la gráfica 5, observándose el contenidos de clorofila a y b. Se obtuvo como resultados que el tratamiento testigo mostró mayor contenido de clorofila a, ($7,5\mu\text{g/g}$ de materia seca) que el tratamiento con nitrógeno líquido ($5\mu\text{g/g}$ de materia seca) encontrándose diferencias significativas entre ambos. Mientras que en los resultados del contenido de clorofila b no se obtuvo diferencias estadísticas de un tratamiento respecto al, pero en el tratamiento testigo fueron mayores los contenidos de clorofila b ($8\mu\text{g/g}$ de materia seca).

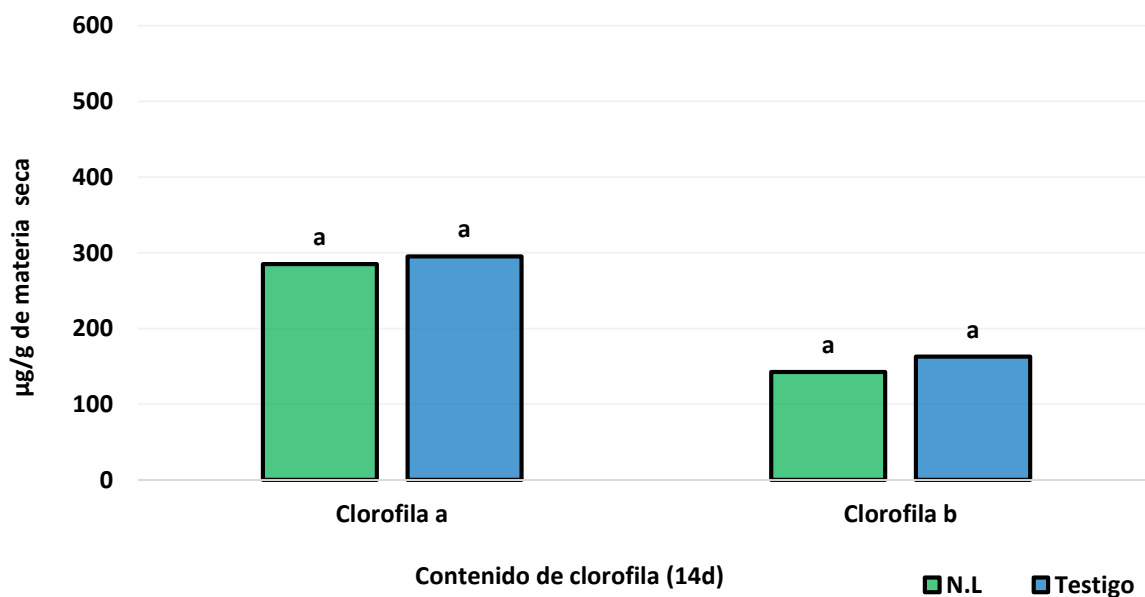


Gráfica 4. Contenidos de clorofila a y b en la raíz de plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura a los 14 días de germinadas. Medias con letras desiguales, significan diferencias estadísticas entre los tratamientos de un mismo elemento evaluado. (t -student; $p < 0.05$). E.E.=0.43, E.E.=0.63.

La gráfica 5 muestra el contenido de clorofila a y b en tallos de plántulas de la especie *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura obtenidas de semillas escarificadas con nitrógeno líquido y un tratamiento testigo a los 14 días de germinadas. En cuanto al contenido de clorofila a no se muestran diferencias estadísticas entre los dos tratamientos, lo mismo ocurre para la clorofila b siendo los valores de ambos tratamientos estadísticamente iguales.



Gráfica 5. Contenidos de clorofila a y b en tallos de plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura a los 14 días de germinadas. Medias con letras desiguales, significan diferencias estadísticas entre los tratamientos de un mismo elemento evaluado. (t- student, $p < 0.05$). E.E.=5.63, E.E.=2.25.



Gráfica 6. Contenidos de clorofila a y b en hojas de plántulas de la especie *T. labialis*, Cultivar Semilla Oscura a los 14 días de germinadas. Medias con letras desiguales, significan diferencias estadísticas entre los tratamientos de un mismo elemento evaluado. (t- student, $p < 0.05$). E.E.=10.31, E.E.=4.11.

El contenido clorofila a y b en hojas de plántulas de la especie *T. labialis*, se observan en la gráfica 6. Las hojas del tratamiento testigo a los 14 días de germinadas muestran un contenido de clorofila a (300µg/g de materia seca), sin presentar diferencia significativa respecto al tratamiento con nitrógeno líquido, (291µg/g de materia seca). Con respecto al contenido de clorofila b fue mayor para el tratamiento testigo (165µg/g

de materia seca) sin diferencias estadísticas con respecto al tratamiento testigo (147 μ g/g de materia seca).

Los resultados de la gráfica 7 muestran el contenido de clorofila a y b en raíces de plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura a los 28 días de germinadas, se puede observar que el contenido de clorofila a y b fue mayor para el tratamiento testigo con respecto al tratamiento con nitrógeno líquido, encontrándose diferencias estadísticas entre ambos tratamientos. Además los contenidos de clorofilas, tanto a, como b, son bajos lo que se corresponde con el órgano de la planta evaluado.

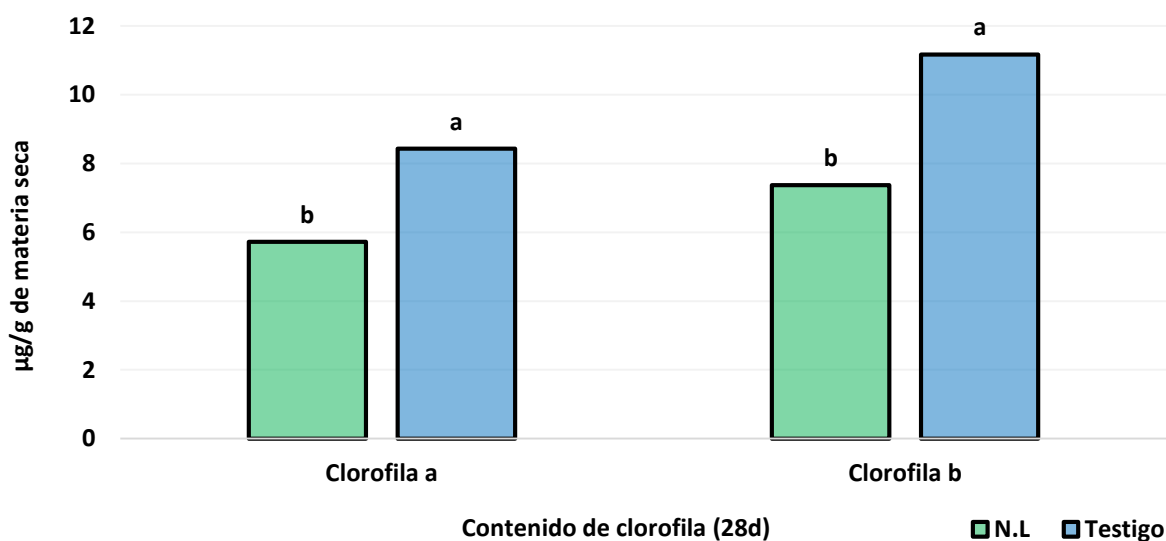
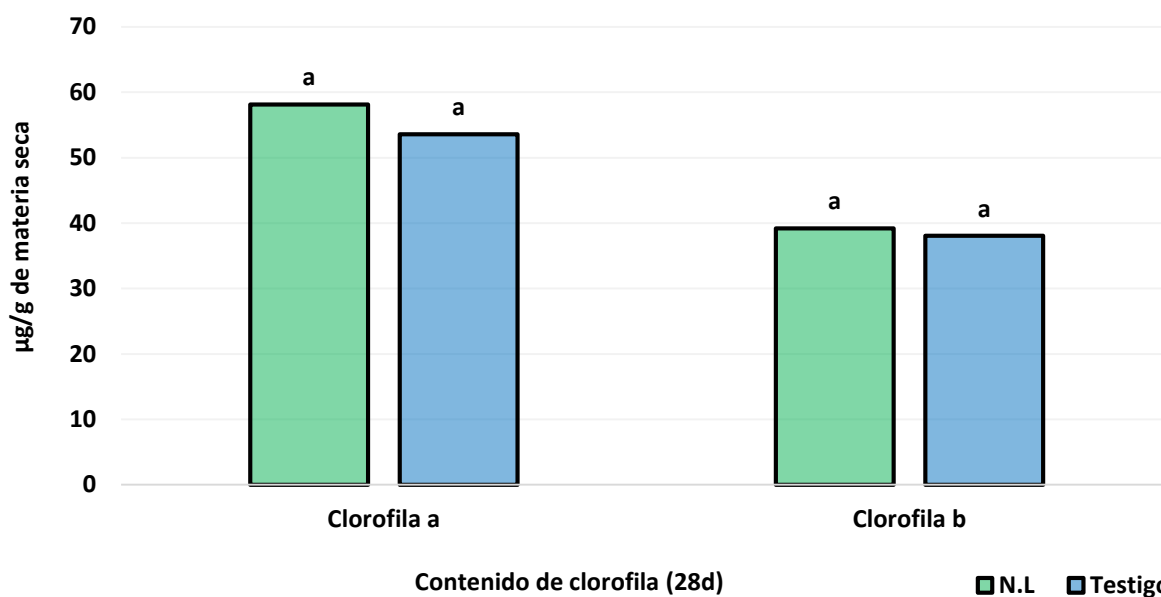


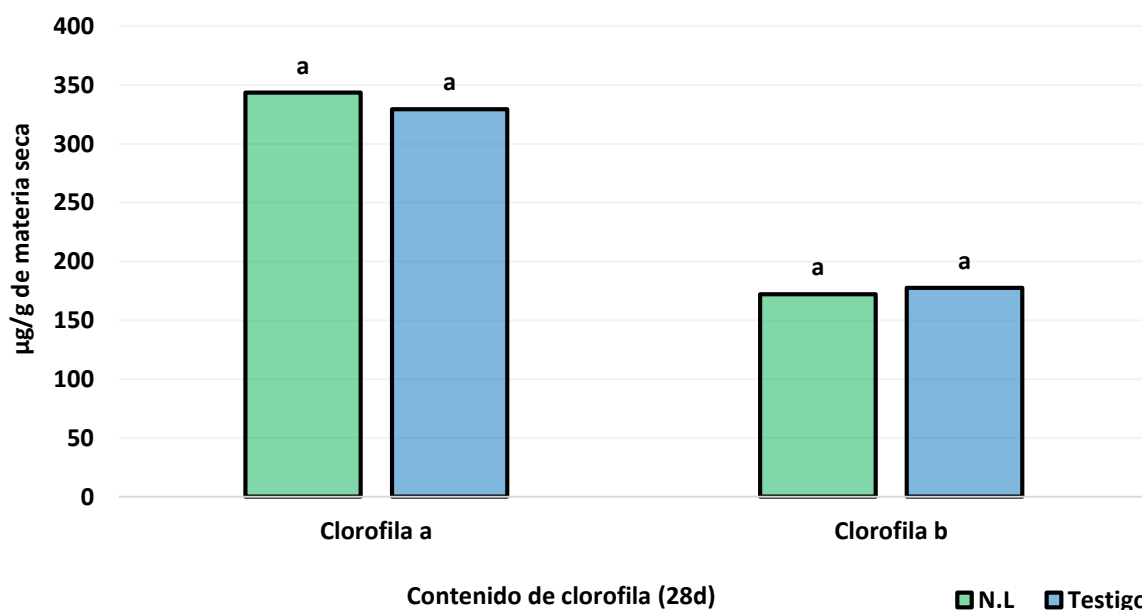
Figura 7. Contenido de clorofila a y b en raíces de plántulas de *T. labialis*, cultivar Semillas Oscuras a los 28 días de germinadas. Medias con letras desiguales, significan diferencias estadísticas entre los tratamientos de un mismo elemento evaluado. (t- student, $p < 0.05$). E.E.=0.43, E.E.=0.32.

En cuanto al contenido de clorofila a y b en tallos de plántulas de *T. labialis*, del cultivar Semilla Oscura a los 28 días de germinadas (Gráfica 8), los mayores valores en ambas determinaciones se obtienen en el tratamiento con nitrógeno líquido, con 58 y 39 μ g/g de materia seca respectivamente para clorofila a y b. A pesar de lo anterior no se muestra diferencia significativa entre ambos tratamientos evaluados.



Gráfica 8. Contenido de clorofila a y b en tallos de plántulas de *T. labialis* del cultivar Semilla Oscura. Medias con letras desiguales, significan diferencias estadísticas entre los tratamientos de un mismo elemento evaluado. (t- student, $p < 0.05$). E.E.=5.81, E.E.=2.63.

En la gráfica 9 se muestra el contenido de clorofila a y b en hojas de plántulas de *T. labialis*, a los 28 días de germinadas. Se puede observar que en la determinación del contenido de clorofila a el tratamiento con nitrógeno líquido obtuvo más contenido de clorofila, mientras que el contenido de clorofila b fue mayor para el tratamiento testigo sin mostrar diferencia significativa respecto al tratamiento con nitrógeno líquido.



Gráfica 9. Contenido de clorofila a y b en hojas de plántulas de *T. labialis* del cultivar Semilla Oscuras. Medias con letras desiguales, significan diferencias estadísticas entre los tratamientos de un mismo elemento evaluado. (t- student, $p < 0.05$, $n=3$). E.E.=18.14, E.E.=11.12.

Las clorofilas son un componente clave de la fotosíntesis y se requieren para la absorción de la luz. No obstante, producto de sus propiedades para absorber luz, las clorofilas pueden convertirse en potenciales fototoxinas celulares y resultan ser moléculas dañinas. Esto se pone de manifiesto en situaciones donde el aparato fotosintético de las plantas se sobreexcita, por ejemplo, bajo condiciones de alta intensidad de luz (Hörtensteiner y Krautler, 2011). Producto del potencial de toxicidad, el metabolismo de las clorofilas es fuertemente regulado durante el desarrollo de las plantas. Esto hace que la bioquímica y la regulación de la biosíntesis de las clorofilas son intensamente estudiadas (Hörtensteiner y Krautler, 2011).

Durante la germinación, la ruptura de las clorofilas puede ser un prerrequisito de desintoxicación de pigmentos potencialmente fototóxicos en el interior de las vacuolas con el fin de permitir la movilización del nitrógeno ligado a las proteínas de las clorofilas (Hörtensteiner, 2006), un proceso que pudo no ocurrir en las hojas de plantas procedentes de semillas escarificadas con nitrógeno líquido. El estrés producido por las bajas temperaturas durante la crioconservación de las semillas quizás pudo provocar señales que se expresaran en un incremento en los niveles de clorofilas de las semillas; sin embargo, el porcentaje de germinación y la buena calidad de las plantas que se obtuvieron en ambos tratamientos, demuestran que los niveles en el contenido de las clorofilas no fueron suficientes para causar toxicidad.

Esto resulta contrario a los resultados de Al-Sobhi *et al.*, (2006), que evaluaron el efecto del estrés salino en el contenido de clorofilas de hojas de algodón de seda (*Calotropis procera*, Aiton) y observaron efectos de la salinidad en el contenido de clorofilas y en la calidad de las plantas, especialmente cuando los niveles eran de 160 y 320 mMNaCl. Tal razón indica la necesidad de otros estudios para poder lograr una mayor comprensión de este hecho.

4.2.3 Contenido de fenoles (ligados a la pared celular y soluble)

En la tabla 2 se muestra el contenido de fenoles ligados a la pared celular en plántulas de la especie *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura, obtenidas de semillas escarificadas con nitrógeno líquido y el tratamiento testigo a los 14 y 28 días de germinadas. Los

contenidos de fenoles ligados a la pared celular a los 14 días de germinación fueron mayores, en todos los órganos evaluados, para el tratamiento con nitrógeno líquido, encontrándose diferencias significativas con respecto al tratamiento testigo. En tanto, para las evaluaciones realizadas a los 28 días, no se encontraron diferencias estadísticas entre ambos tratamientos. Estos resultados demuestran que las plantas durante su desarrollo tienen la capacidad de recuperarse de los daños sufridos por el estrés, en este caso por las bajas temperaturas. Resultados similares a estos fueron alcanzados por Cejas, (2014) cuando evaluó el contenido de fenoles en plantas de frijol obtenidas de semillas crioconservadas.

Tabla 2. Contenido de fenoles ligados a la pared celular de raíz, tallos y hojas de plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura a los 14 y 28 días de germinadas.

Fenoles ligados a la pared celular (mg/g masa fresca)						
	Raíz 14d	Tallo 14d	Hojas 14d	Raíz 28d	Tallo 28d	Hojas 28d
Testigo	29,18	27,76	38,06	11,95	16,02	31,59
N. líquido	39,44	34,09	43,14	12,09	15,91	29,72
Sig	*	*	*			
E.E.	1.58	1.74	2.35	1.49	1.32	2.24

(*) significa diferencias estadísticas entre tratamientos en una misma columna, (t-student, $p < 0.05$, $n=3$).

El contenido de fenoles solubles en plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura, obtenidas de semillas escarificadas con nitrógeno líquido y el tratamiento testigo a los 14 y 28 días de germinadas se muestra en la tabla 3. Como muestran los resultados, a los 14 días de germinadas las plantas, las hojas del tratamiento con nitrógeno líquido fue donde más se encontraron contenidos de fenoles solubles (41,90 mg/g masa fresca). Este mismo comportamiento se registró en las hojas del tratamiento testigo a los 28 días. Solo se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, en las raíces y tallos a los 28 días.

Según Kuskoski *et al.*, (2005) los fenoles, muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo. Así mismo funciona como mecanismo beneficioso en la prevención de daños celulares. A pesar de lo anterior, se tienen pocas referencias sobre la influencia de la crioconservación en el contenido de fenoles,

sin embargo, Dinelli *et al.* (2006) encuentran una gran variabilidad en el contenido de fenoles totales en cultivos de frijol, ellos sugieren que puede ser producto del genotipo y/o las condiciones ambientales en que se desarrolle el cultivo.

Tabla 3. Contenido de fenoles solubles en raíz, tallos y hojas de plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura a los 14 y 28 días de germinadas.

Fenoles solubles (mg/g masa fresca)						
	Raíz 14d	Tallo 14d	Hojas 14d	Raíz 28d	Tallo 28d	Hojas 28d
Testigo	35,42	33,69	40,81	6,34	9,99	26,45
N. Líquido	38,36	32,43	41,90	8,17	12,33	25,06
Sig.				*	*	
E.E.	3.21	2.65	3.41	0.54	0.75	1.69

(*)

significa diferencias estadísticas entre tratamientos en una misma columna, (t-student, $p < 0.05$, $n=3$).

Los altos contenidos de fenoles ligados a la pared celular, en las plantas procedentes de semillas tratadas con nitrógeno líquido con respecto al tratamiento testigo, en las evaluaciones realizadas a los catorce días demuestran que las plantas en esta fase se encontraban bajo un fuerte poder oxidativo. Contrario a lo anterior, a los 28 días, las plántulas se habían recuperado por completo, gracias a la acción antioxidante de los fenoles y a su capacidad para reparar los daños celulares. Contrario a lo ocurrido en esta investigación, en las semillas de frijol y soya, Arguedas, (2016) encontró una tendencia a aumentar; similar a lo hallado por Zevallos *et al.*, (2013) en hojas de *Solanum lycopersicum* provenientes de semillas germinadas después de la crioconservación.

4.2.4 Contenido de malondialdehído y otros aldehídos.

En las plantas, tanto el malondialdehído como los otros aldehídos están relacionados con procesos de estrés biótico (Companioni *et al.*, 2005) y abiótico (Yabor *et al.*, 2006, 2008, Pérez *et al.*, 2012). El malondialdehído se genera por la ruptura de los ácidos grasos poliinsaturados y se utiliza para determinar el grado de peroxidación lipídica en las membranas. Es un metabolito primario de respuesta al estrés en las plantas (Dumet y Benson, 2000), por lo que se considera un marcador del daño oxidativo. El aumento de su contenido indica la inducción exitosa del estrés oxidativo. De esta manera, la

peroxidación lipídica también implica la formación y propagación de radicales lipídicos, pérdida de oxígeno y la eventual destrucción de las membranas, lo que genera una variedad de productos que incluye cetonas, alcoholes, éteres y aldehídos.

En la tabla 4 se muestra el contenido de malondialdehídos en plántulas de *T. labialis* cultivar Semilla Oscura a los 14 y 28 días después de germinadas, de estas plántulas, unas provienen de semillas tratadas con nitrógeno líquido y las otras son testigo. Se puede observar que las plántulas con 14 días de germinadas mostraron mayor valor de materia seca en todos los órganos evaluados, pero solo se encontraron diferencias significativas en la raíz y las hojas. En las plántulas con 28 de germinadas también hay diferencia significativa en las hojas donde el tratamiento testigo mostró un mayor contenido de malondialdehídos que el tratamiento con nitrógeno líquido. En los demás órganos evaluados a los 28 días, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 4. Contenido de Malondialdehídos en plántulas de la especie *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura, a los 14 y 28 días después de germinadas.

Malondialdehídos ($\mu\text{g/g}$ de materia seca)						
	Raíz (14d)	Tallo (14d)	Hojas (14d)	Raíz (28d)	Tallo (28d)	Hojas (28d)
Testigo	25.8	49.33	52.03	10.24	20.97	41.74
N. líquido	30.27	50.66	57.69	11.93	23.55	30.11
Sig.	*		*			*
E.E.	1.55	2.63	3.20	0.81	1.23	2.30

(*) significa diferencias estadísticas entre tratamientos en una misma columna, (t-student, $p < 0.05$, $n=3$).

El contenido de otros aldehídos en plántulas de *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura, tratadas con nitrógeno líquido a los 14 y 28 días de germinadas, se muestran en la tabla 5. Se puede observar que a los 14 días de germinadas la raíz tuvo un contenido de otros aldehídos de $34,2 \mu\text{g/g}$ de materia seca para el tratamiento con nitrógeno líquido el cual no presentó diferencia estadísticas con respecto al tratamiento testigo. Las diferencias estadísticas se registraron para los siguientes órganos, tallos a los 14 días y raíz a los 28 días.

En el experimento que se analiza se pudo observar, que el decrecimiento en el contenido de malondialdehído, estuvo aparejado al decrecimiento en el contenido de otros aldehídos en las primeras etapas de crecimiento y desarrollo de las plantas; lo que coincide con Martínez-Montero *et al.*,(2002), quienes observaron esta misma tendencia en la fracción microsomal de callos crioconservados de caña de azúcar cuando los compararon con callos no crioconservados, durante los tres primeros días posteriores a la exposición al nitrógeno líquido. Los resultados obtenidos están dados por lo planteado por Menon *et al.*, (2014), quienes explican que el estrés por crioconservación incrementa el contenido de compuestos que son necesarios para la estabilización de la membrana como un mecanismo de tolerancia el inicio de la fase de crecimiento de las plantas.

Tabla 5.Contenido de otros aldehídos en plántulas de la especie *T. labialis*, cultivar Semilla Oscura a los 14 y 28 días después de germinadas.

Otros aldehídos (µg/g de materia seca)						
	Raíz (14d)	Tallo (14d)	Hojas (14d)	Raíz (28d)	Tallo (28d)	Hojas (28d)
Testigo	32,15	25,85	29,54	2,99	6,50	14,97
N. líquido	34,2	21,62	32,94	4,21	7,94	15,16
Sig.		*		*		
E.E.	2.14	1.73	1.96	0.18	0.46	0.96

(*) significa diferencias estadísticas entre tratamientos en una misma columna, (t-student, $p < 0.05$, $n=3$).

5. Conclusiones.

- Con la inmersión de semillas de *T. labialis*, en nitrógeno líquido se logró porcentajes de germinación (91%) superior al tratamiento testigo (35%).
- El crecimiento, masa fresca y masa seca de plántulas de *T. labialis*, fueron mayores para el tratamiento con nitrógeno líquido.
- De acuerdo con estos resultados se producen algunos cambios en la actividad metabólica en plantas de *T. labialis*, obtenidas de semillas escarificadas con nitrógeno líquido, pero esto no afecta el desarrollo fenológico de las plántulas hasta los 28 días.

6. Recomendaciones

- Continuar el estudio del efecto de la crioconservación en relación con otros indicadores bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo.
- Tener en cuenta los resultados como referencia para interpretar la respuesta fisiológica en la aplicación de la crioconservación de otras semillas ortodoxas.

7. Revisión bibliográfica.

- Acharya SN, Stout DG, Brooke B, Thompson. D 1999 Cultivar and storage effects on germination and hard seed content of alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 79, 201-208.
- Acosta, Y. 2014. Ruptura de la dormancia en semillas de *Teramnus labialis* (L.f.) Spreng. por el efecto del Nitrógeno líquido, para su establecimiento en una plantación de *Psidium guajava*(L.). Tesis presentada en opción al grado de Master en Ciencias Agrícolas. Ciego de Ávila. 76 p.
- Acosta, Y. Hernández L. Mazorra, C. Quintan, N. Zevallos, B. Ceja, I. Sershen, N. Lorenzo, C. Martínez-Montero, M y Fontes, D. 2019. Seed cryostorage enhances subsequent plant productivity in the forage species *Teramnus labialis* (L.F.) SPRENG. *Cryo Letters* 40 (1), 36-44(2019).
- Acosta, Y., Fontes, D., Martínez, M. E., Mazorra, C., Cejas, I., González, A., García, J.A. 2012. Respuesta germinativa de cuatro especies de leguminosas forrajeras a la inmersión en nitrógeno líquido. *Memorias X Conferencia Científica*.
- Allen, P.S. y Meyer, S.E. 1998. Ecological aspects of seed dormancy loss. *Seed Sci. Res.* 8:183.
- Al-Sobhi, O. A., Al-Zahrani, H. S., Al-Ahmadi, S. B. 2006. Effect of salinity on chlorophyll & carbohydrate contents of *Calotropis procera* seedlings. *King Fasil University J*, 7, 105-115.
- Alves, E.U.; Saderz, R.; Bruno, R.L.A.; Alves, A.U. 2004. Dormência e desenvolvimento de sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth). *Revista Árbore*. 28(5):665-662.
- AOAC .1990. Official methods of analysis, 15th edn. AOAC International, Gaithersburg, USA, 1067 p
- Arguedas, K. 2014. Estudios fisiológicos y bioquímicos relacionados con la conservación de germoplasma vegetal de *Phaseolus vulgaris* L, *Glycine max* L y *Zea mays* L en Nitrógeno líquido. Tesis presentada en opción al Título de Master en Agrobiotecnología. Ciego de Ávila. 50 p.
- Arguedas, M. Pérez, A. Abdelnour, A. Hernández, M. Engelmann, F. Martínez, M. Yabor, L y Lorenzo, J. 2016. Short-Term Liquid Nitrogen Storage of Maize, Common Bean and Soybean Seeds Modifies Their Biochemical Composition. *Agricultural Science*. Volume 4, No. 3. 6-12 p.

- Baskin CC, Baskin JM. 2014. Seeds: Ecology, Biogeography, and evolution of Dormancy and Germination, 2nd Edition, Academic Press, New York, USA.
- Baskin, C.C. y Baskin, J.M. 1998. Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press, San Diego. 666p.
- Baskin, C.C. y Baskin, J.M. 2005. Seed dormancy in wild flowers. En Flower Seeds: Biology and technology (M. B. McDonald y F. Kwong, Eds.). CABI Wallingford, UK. p.163.
- Baskin, J.M.; Baskin, C.C.; Dixon, K.W. 2006. Physical dormancy in the endemic Australian genus *Stylobasium*, a first report for the family Surianaceae (Fabales). *Seed Sci. Res.* 16:229-232.
- Baskin, J.M.; Baskin, C.C.; Li, X. 2000. Taxonomy, ecology, and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology.* 15:139-152.
- Benson, E. E. 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *Critical reviews in plant sciences*, 27(3), 141-219.
- Benson, E. E., Bremner, D. 2004. Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view. *Life in the frozen state. CRC Press, Boca Raton*, 206-241.
- Besnier, F. 1965. Semillas: Biología y Tecnología. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España. 394p.
- Bewley, J. D.; K. J. Bradford; H. W. M. Hilhorst; H. Nonogaki. . 2013. Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. 3 ra edn. Springer, New York.
- Bewley, J.D. & Black, M. 1994. Seeds, physiology of development and germination. Plenum Press, New York. 445 p.
- Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell.* 9:1055-1066.
- Binder, U. 1997. Manual de Leguminosas de Nicaragua. PASOLAC: Estelí. 191p.
- Bradford K.J. 2005. Threshold models applied to seed germination ecology. *New Phytologist* 165: 338-341.
- Bradford, K.J., Argyris, J.; Dahal, P. y O'Brien, L. 2006. Genetics, regulation and modeling of seed dormancy. Abstracts, 26th Annual Meeting of the Argentine Society of Plant Biologists.
- Camacho, F. Dormición de semillas: causas y tratamientos. México, DF: Editorial Trillas, 1994. 128 p
- Cardoso, F.A.; Pita, J.M.; Palmeira, J. 2000. Efecto de la crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, 2 (1): 67-71.

- Carpentier, S. C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., Panis, B. 2005. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 5(10), 2497-2507.
- Carpentier, S. C., Witters, E., Laukens, K., Van Onckelen, H., Swennen, R., Panis, B. 2007. Banana (*Musa spp.*) as a model to study the meristem proteome: acclimation to osmotic stress. *Proteomics*, 7(1), 92-105.
- Carpentier, S., Witters, E., Laukens, K., Swennen, R., Panis, B. 2006. 128. Proteome research of banana meristems to study cryoprotection. *Cryobiology*, 53(3), 422.
- Carvalho, N.M. y Nakagawa, J. 2000. Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção. FUNEP. Jaboticabal, Sao Paulo. 588 p.
- CATIE. 2000. Técnicas para la germinación de semillas forestales. Serie Técnica. Manual Técnico N° 39. CATIE-PROSEFOR-DFSC. Turrialba, Costa Rica. 54 p.
- Cejas, I. 2014. Semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) modelo para caracterizar los efectos de la crioconservación en la germinación, el crecimiento y desarrollo de las plantas. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Ciego de Ávila. 135 p.
- Cejas, I.; Vives. K.; Laudat, T.; González-Olmedo, J.; Engelman, F.; Martínez –Montero, M.; Lorenzo, J.C. 2012. Effect of cryopreservation of *Phaseolus vulgaris* L. seeds on early stages of germination. *Plant Cell Report*. 31(11):2065-2073.
- Chamorro, D.R. 1998. Gramíneas y leguminosas: Consideraciones agrozootécnicas para ganaderías del trópico bajo. Boletín de investigación, CORPOICA, Regional 6. Centro de Investigación «Nataima», El Espinal, Tolima, Colombia. p. 51
- Chang, Y., Reed, B. M. 2000. Extended alternating-temperature cold acclimation and culture duration improve pear shoot cryopreservation. *Cryobiology*, 40(4), 311-322.
- Chin, H.F.; Roberts. E.H. 1980. Recalcitrant Crop Seeds. Tropical PressSDN. BHD, Kuala Lumpur.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J. K. 2006. Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum*, 126 (1), 52-61.
- Cohn, M.A. 2006. Dormancy: an overview. En: The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses (J.D. Bewley, M. Black y P. Halmer, Eds.). CABI Publishing. Wallingford, UK.

- Companioni, B., Mora, N., Díaz, L., Pérez, A., Arzola, M., Espinosa, P., Hernández, M., Ventura, J., Pérez, M.C., Santos, R., Lorenzo, J. C. 2005. Identification of discriminant factors after treatment of resistant and susceptible banana leaves with *Fusariumoxysporum* f. sp. cubense culture filtrates. *Plant Breeding*, 123, 1-.
- Costa, G., Spitz, E. 1997. Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, protein content of in vitro cultured *Lupinus albus*. *Plant Science*, 128, 131-140.
- Criel, B., Carpentier, S., Renaut, J., Panta, A., Swennen, R., Panis, B., & Hausman, J. F. 2005. Cryopreservation and abiotic stress tolerance in potato: a proteomic approach. In *COST 843 final conference/COST 843 and COST 851 joint meeting*. p 1-263.
- Dell, B.1980. Structure and function of the strophilar plug in seeds of *Albizialophanta*. *American Journal of Botany*. 67:556
- Dhanaraj, A. L., Alkharouf, N. W., Beard, H. S., Chouikha, I. B., Matthews, B. F., Wei, H., Rowland, L. J. 2007. Major differences observed in transcript profiles of blueberry during cold acclimation under field and cold room conditions. *Planta*, 225(3), 735-751.
- Dias, D. 2005. Dormancia en semillas. *Revista SEED News*.IX(4).http://www.seednews.inf.br/espanhol/seed94/artigocapa94_esp.shtml
- Dinelli, G., Bonetti, A., Minelli, M., Marotti, I., Catizone, P., Mazzanti, A. 2006. Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes. *Food Chemistry*. 99, 105–114. doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.028.
- Doyle, J. 2013. Advances in legume systematics in a post-genomic world. *Sixth International Legume conference 2013*. Johannesburg, South Africa. p 53.
- Dumet, D., Benson, E. E. 2000. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. En: *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. Engelmann, F., Takagi, H., (eds.) Rome, Tsukuba: JIRCAS, IPGRI: p 43-56.
- Ellis, R.H.; Hong, T.D.; Roberts, E.H. 1990. An intermediate category of seed behaviour? 1. Coffee. *Journal of Experimental Botany* 41, 1167-1174.
- Engelmann, F. y Takagi, H. 2000. Cryopreservation of tropical germplasm. Current research progress and application. Japan International Research Center for

- Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Institute, Rome, Italy.
- Ericson, M. C., Alfinito, S. H. 1984. Proteins produced during salt stress in Tobacco cell culture. *Plant Physiology*, 74, 506-509.
- Eynard, I. 1958. Effect of very low temperatures on germination of hard seeds. *Herb. Abst.* 28, 10-27.
- Fleck, R. A, Day, J. G., Clarke, K. J., Benson, E. 1999. Elucidation of the metabolic and structural basis for the cryopreservation recalcitrance of *Vaucheria sessilis*, Xanthophyceae. *CryoLetters*, 20, 271–282.
- Fleck, R. A., Benson, E., Bremner, D. H., Day, J. G. 2000. Studies of free radical-mediated cryoinjury in the unicellular alga *Euglena gracilis* using a non-destructive hydroxyl radical assay: A novel approach for developing protistan cryopreservation strategies. *Free Radical Research*, 32, 157–170.
- Fleck, R. A., Benson, E., Bremner, D. H., Day, J. G. 2003. A comparative study of antioxidant protection in the cryopreserved unicellular algae *Euglena gracilis* and *Haematococcus pluvialis*. *CryoLetters*, 24, 213–228.
- Foley, M.E. 2001. Seed dormancy: An update on terminology, physiological genetics, and quantitative trait loci regulating germinability. *Weed Science* 49:305-317.
- Foley, M.E. y Fennimore, S.A. 1998. Genetic basis for seed dormancy. *SeedSci*.
- Fontes D, Mazorra C, Pulido L, Cubillas N, Hernández N, Lazo M, Rodríguez LA, Rodríguez W .2008. *Teramnus labialis*: leguminosa promisorio para la producción diversificada en fincas cítricas. *Zootecnia Tropical*. 26(3): 351-354.
- Fontes, D. 2007. Beneficios agroproductivos de *Teramnus labialis* (L.f.) Spreng. como cobertura en plantaciones cítricas. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. 143 p.
- Forcella, K.; Benech, R.L.; Sánchez, R. y Ghera, C.M. 2000. Modeling seedling emergence. *Field Crops Research*. 67:123-139.
- Forni, C., Braglia, R., Beninati, S., Lentini, A., Ronci, M., Urbani, A., Provenzano, B., Frattarelli, A., Tabolacci, C., Damiano, C. 2010. Polyamine concentration, transglutaminase activity and changes in protein synthesis during cryopreservation of shoot tips of apple variety Annurca. *CryoLetters*, 31(5), 413-425.
- García, J. A. 2012. Respuesta germinativa de cuatro especies de leguminosas forrajeras a la inmersión en nitrógeno líquido.

- Geneve, R. L. 2003. Impact of temperature on seed dormancy. *HortScience*.38:336-341.
- Gómez, I. *et al.* 2002. Producción de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Ipil Ipil en áreas de la premontaña Sierra Maestra. *Pastos y Forrajes*. 25:11
- Gray, G. R., Heath, D. 2005. A global reorganization of the metabolome in *Arabidopsis* during cold acclimation is revealed by metabolic fingerprinting. *Physiology Plant*, 124, 236–248.
- Gurr, S., McPherson, J., Bowles, D. 1992. Lignin and associated phenolic acids in cell walls. In D. L. Wilkinson, ed. *Molecular Plant Pathology*. Oxford Press, Oxford. p. 51-56.
- Gutiérrez, I.R. *et al.* 2002. Coberturas vivas de leguminosas en el plátano (*Musa sp.*) FHIA 03. *Cultivos tropicales* 23 (3):11-17
- Hamid, N., Bukhari, N., Jawaid, F. 2010. Physiological responses of *Phaseolus vulgaris* to different lead concentration. *Pakistan Journal Botany*. 42(1), 239–246.
- Handley, R.J. y Davy, A.J. 2005. Temperature effects on seed maturity and dormancy cycles in an aquatic plant, *Najas marina*, at the edge of its range. *Journal of Ecology* 93:1185-1193.
- Hannah, M. A., Heyer, A. G., Hinch, D. K. 2005. A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 1, 0179–0196.
- Harding K (2004) Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A Review. *Cryo-Letters*, 25: 3-22.
- Harding, K., Benson, E. E. 2001. The use of microsatellite analysis in *Solanum tuberosum* L. in vitro plantlets derived from cryopreserved germplasm. *Cryo Letters*, 22: 199–208
- Harper, J.L. 1977. Population biology of plants. Academic Press. New York. 892p.
- Heath, R., Packer, J. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplast: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 125, 189-198.
- Hilhorst, H.W.M. y Bradford, K.J. 2000. Seed physiology. International Course on Seed Production and Seed Technology. IAC. Wageningen, Netherlands. 74 p.
- Hilhorst, H.W.M. y Toorop, P.E. 1997. Review on dormancy, germinability, and germination in crop and weed seeds. *Advances in Agronomy*. 61:111-165.
- Hörtensteiner, S. 2006. Chlorophyll degradation during senescence. *Annual Review Plant Biology*, 57, 55-57.
- Hörtensteiner, S., Krautler, B. (2011). Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, 977- 988.

- ISTA.2010. International rules for seed testing, Bassersdorf. International Seed Testing Association.
- Johnston, M.; Olivares, A.; Henríquez, C. y Fernández, G. 1997. Factores abióticos en la germinación de terófitas de interés forrajero. *Ayton*. 60:63-66.
- Harper, J.L. 1977. Population biology of plants. Academic Press. New York. 892p.
- Kannan, C.S.; Sudhakara, K.; Augustine, A.; Ashokan, P.K. 1996. Seed dormancy and pre-treatments to enhance germination in select *Albizia* species. *Journal of Tropical Forest Science*. 8:369.
- Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D. W., Zhao, W., Schiller, K. C., Gatzke, N., Sung, D., Guy, C. L. 2004. Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136, 4159–4168.
- Keurentjes, J. J. B., Koornneef, M., Vreugdenhil, D. 2008. Quantitative genetics in the age of omics. *Curr. Opin. Plant Biology*, 11, 123-128.
- Kigel J. 1995. Seed germination in arid and semiarid regions. En: Seed development and germination (J. Kigel y G. Galili, Eds.). Marcel Dekker Inc. New York. p. 645.
- Kozłowski, T.T. y Pallardy, S.G. 2002. Acclimation and adaptive response of woody plants to environmental stresses. *Botanical Review*. 8:270.
- Kuskoski, M.; Asuero, A.; Troncoso, A.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)*. 25(4):726-732 ISSN 1678-457X.
- Laflin, J. 1995. Scarification. Disponible en: <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/146/htm/vidayob.htm>. Consultado (15/4/2012).
- Leadem, C.L. 1997. Dormancy—Unlocking seed secrets. En: National Proceedings, Forest and Conservation Nursery Associations. (Landis, T.D.; Thompson, J.R., Eds.) Gen. Tech. Rep. PNWG TR-419. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station: 43-52.
- Li, B. y Foley, M.E. 1997. Genetic and molecular control of seed dormancy. *Trends in Plant Science*. 2:384-389.
- Machado, R. & Olivera, Yuseika. 2008. Caracterización morfológica de una colección de *Teramnus* spp. *Pastos y Forrajes*. 31:119
- Machado, R. 2004. Botánica de leguminosas. Conferencia. Programa de Maestría en pastos y forrajes. Curso de Fundamentos de la Producción de Pastos.

- Martín.2018, Influencia de la temperatura y la luz en la germinación de semillas de dos especies de leguminosas herbáceas tropicales. Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Agrónomo, pp 18.
- Martínez-Montero, M. E., Mora, N., Quiñones, J., González-Arno, M. T., Engelmann, F., Lorenzo, J. C. 2002. Effect of cryopreservation on the structural and functional integrity of cell membranes of sugarcane (*Saccharum* sp.) embryogenic calluses. *CryoLetters*, 23, 237-244.
- Matilla, A. 2003. Ecofisiología de la germinación de semillas. En: M. J. Reigosa, N. Pedrol y A. Sánchez-Moreiras, eds. La Ecofisiología Vegetal. Unaciencia de síntesis. 29: p. 901-922. Paraninfo S.A., Madrid.
- Menéndez, J. 1982. Estudio regional y clasificación de las leguminosas forrajeras autóctonas y/o regionalizadas en Cuba.
- Menon, A., Funnekotter, B., Kaczmarczyk, A., Bunn, E., Turner, S., Mancera, R. L. 2014. Cold-induced changes affect survival after exposure to vitrification solution during cryopreservation in the south-west Australian Mediterranean climate species *Lomandra sonderi* (*Asparagaceae*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* doi:10.1007/s11240-014-0538-9.
- Mohan, B. S., Hosetti, B. B. (1997). Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* L. growth in sewage stabilization ponds. *Environment Pollution*, 98, 233-236.
- Morrison, D.A.; McClay, K.; Porter, C.; Rish, S. 1998. The role of the lens in controlling heat-induced breakdown of testa-imposed dormancy in native Australian legumes. *Ann. Bot.* 82:35-40.
- Morrison, N., Cochrane, G., Faruque, N., Tatusova, T., Tateno, Y., Hancock, D., Field, D. 2006. Concept of sample in OMICS technology. *OMICS Journal Integral Biology*, 10, 127-137.
- Navarro, M. 2002. Evaluación del vigor de las semillas de *Albizia lebbek* (L.) Benth durante la emergencia de plántulas. Tesis en opción al título de Master en Pastos y Forrajes. Universidad de Matanzas, Cuba. 77 p.
- Navarro, M.; Mesa, A.; González, Y. 2002. Capacidad germinativa de las semillas de *Albizia lebbek* (L.) Benth. II. Ruptura de dormancia y emergencia de plántulas. *Pastos y Forrajes*. 25:263.
- Nonogaki, H. 2006. Seed Germination - The biochemical and molecular mechanisms. *Breeding Science* 56:93-105.

- Norris, D.O. 1967. *Trop. Grassld.* 1:107.
- Oliveira, F.L. de & Manhaes, S. 2003. Establecimiento de leguminosas forrageira tropicais na sombra. *Pasturas Tropicales.* 25 (3):12
- Palma, 2002. Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: rol of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistr,* 40(6-8), 521-350.
- Pérez, G., Yanez, E., Mboghli, A., Valle, B, Sagarra, F., Yabor, L., Aragón, C., González-Olmedo, J., Isidrón, M., Lorenzo, J. C. 2012. New Pineapple Somaclonal Variants: P3R5 and Dwarf. *American Journal Plant Science,* 3, 1-11.
- Porra, R. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research,* 73, 149-156.
- Poulsen, K. y Stubsgaard, F. 2000. Tres métodos de escarificación mecánica de semillas de testa dura. En: Técnicas para la escarificación de semillas forestales. Serie Técnica. Manual Técnico N° 36. CATIE-PROSEFOR-DFSC. Turrialba, Costa Rica
- Pritchard, H.W. 1995. Cryopreservation of Seeds. En: *Methods in Molecular Biology.* Day, J.G., McLellan, M.R. (Eds.). Humana Press Inc., Totowa, NJ. 38:133-144.
- Rao, N. K.; J. Hanson; M. E. Dulloo; K. Ghosh; D. Novell; M. Larinde. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioversity International, Roma, Italia. 2007. Res. 8:173-182.
- Renaut, J., Hausman, J. F., Wisniewski, M. E. 2006. Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism. *Physiology Plant,* 126, 97-109.
- Renaut, J., Hoffmann, L., Hausman, J. F. 2005. Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing tolerance in poplar plantlets. *Physiology Plant,* 125, 82–94.
- Rock, C. D., Sakata, Y., Quatrano, R. 2010. Stress Signaling I: The Role of Abscisic Acid (ABA). En: A. Pareek, S.K. Sopory, H.J. Bohnert and Govindjee (eds.). *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation.* p 33-73. doi: 10.1007/978-90-481-3112-9_3.
- Rubin, D. L., Lewis, S. E., Mungall, C. J., Misra, S., Westerfield, M., Ashburner, M., Sim, I., Chute, C. G., Musen, M. A. 2006. National Center for Biomedical Ontology:

- advancing biomedicine through structured organization of scientific knowledge. *OMICS Journal Integrative Biology*, 10: 185-198.
- Sakai, A. 2004. Plant cryopreservation. En: *Life in the Frozen State*. Fuller, B., Lane, N. and Benson, E. E. (eds.) CRC Press, London, UK. p 329-345.
- Sakai, A. 1960. Survival of the twig of woody plants at -196°C . *Nature*, 185:393–394.
- Sanabria V. D., R. Silva, M. A. Oliveros, U. Mánrique. 2004. Germinación de semillas de las leguminosas arbustivas forrajeras *Cratylia argentea* y *Cassipourea sarambaea* sometidas a inmersión en ácido sulfúrico. *Bioagro*, 16(3):225-230.
- Sarmiento, M.B. y Schifino-Wittmann, M.T. 2000. Different treatments and their effects on germination of *Leucaena* seeds. *Revista Científica Rural*. 5:89.
- Schmidt, L. 2000. Handling of tropical and subtropical forest tree seed. DFSC. Hummleback, Denmark. 511 p.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion Plant Biology*, 6:410–417.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion Plant Biology*, 3, 217-223.
- Sistachs, E. & Frías, R. 1979. Memoria II Reunión ACPA. 2:134
- Skerman, P. J.; Cameron, D. G. y Riveros, F. 1991. Leguminosas forrajeras tropicales. Colección FAO, Producción y Protección Vegetal. Italia. Roma. 2:707.
- Sung, D. Y., Kaplan, F., Lee, K. J., Guy, C. L. 2003. Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends Plant Science*, 8, 179-187.
- Svensson, J., Ismail, A. M., Palva, E. T., Close, T. J. 2002. Dehydrins. En: Storey, K. B., y Storey, J. M. (eds.). *Sensing Signaling and Cell Adaptation*. Elsevier Science. p 155-171.
- Teketay D. 1996. Germination ecology of twelve indigenous and eight exotic multipurpose leguminous species from Ethiopia. *Forest Ecology Management* 80: 209-223.
- Thomashow, M. F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 50, 571-599.

- Thomashow, M. F. 2001. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiology*, 125, 89-93.
- Thompson, K. *et al.* 2003. Are seed dormancy and persistence in soil related. *Seed Science Research*. 13 (2): 97
- Towill, L. E., Ellis, D. D. 2008. Cryopreservation of dormant buds. En: *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Cap. 16. Reed, B. M. (eds.). Springer, New York, USA. p 421-442.
- Turner, R.; Merritt, D.J.; Baskin, C.C.; Dixon K.W.; Baskin, J.M. 2005. Physical dormancy in seeds of six genera of Australian Rhamnaceae. *Seed Sci. Res.* 15:51-58.
- Van Buskirk, H. A., Thomashow, M. F. 2006. Arabidopsis transcription factors regulating cold acclimation. *Physiology Plant*, 126, 72-80.
- Van Klinken, R.D.; Flack, L.K.; Pettit, W. 2006. Wet-season Dormancy Release in Seed Banks of a Tropical Leguminous Shrub is Determined by Wet Heat. *Annals of Botany*. 98: 875-883.
- Vertommen, A., Carpentier, S. C., Remmerie, N., Witters, E., Swennen, R., Panis, B. 2007. Towards the identification of protein complexes in banana *Musa spp.* meristems. *Agriculture Applied Biology Science. Ghent University*, 72, 1-4.
- Vertucci, C.W. 1989. Effects of cooling rate on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures. *Plant Physiology*, 90:1478-1485.
- Wang, R. 2005. Modeling seed germination and seedling emergence in winterfat (*Krascheninikovia lanata* (Pursh) A.D.J. Meeuse & Smit): physiological mechanisms and ecological relevance. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias. University of Saskatchewan, Saskatoon. 176 p.
- Welbaum, G.E.; Bradford, K.J.; Yim, Kyu-Ock; Booth, D.T. y Oluoch, M. O. 1998. Biophysical, physiological and biochemical processes regulating seed germination. *Seed Sci. Res.* 8:161-172.
- Xin, Z. 2001. Temperature sensing and cold acclimation. *Current opinion in plant biology*, 4(3), 241-246.
- Yabor, L., Aragón, C., Hernández, M., Arencibia, A. D., Lorenzo, J. C. 2008. Biochemical side effects of the herbicide FINALE on bar gene containing transgenic pineapple plantlets. *Euphytica*, 164. 515-520. doi: 10.1007/s10681-008-9743-0

- Yabor, L., Arzola, M., Aragón, C., Hernández, M., Arencibia, A. D., Lorenzo, J. C. 2006. Biochemical side effects of genetic transformation of pineapple. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86, 63-67. doi:10.1007/s11240-006-9097-z
- Yang, T., Zhang, L., Zhang, T., Zhang, H., Xu, S., An, L. 2005. Transcriptional regulation network of cold-responsive genes in higher plants. *Plant Science*, 169, 987-995.
- Yepes, S. 1974. *Cienc. Agrop. Ing. Agron.* Univ. de La Habana. La Habana. 1:15
- Yepes, S.; Alfonso, F.M. & Funes, F. 1971. *Cienc. Agrop. Ing. Agron.* Universidad de La Habana. La Habana. 1:6.
- Zevallos, B.; Cejas, I.; Rodríguez, R.C.; Yabor, L.; Aragón, C.; González, J.; Engelmann, F.; Martínez, M.E.; Lorenzo, J.C. 2013. Biochemical characterization of Ecuadorian wild *Solanum lycopersicum* Mill. plants produced from non-cryopreserved and cryopreserved seeds. *CryoLetters* Jul-Aug34(4):413-421.