



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

## RENDIMIENTO Y CALIDAD DE SEMILLA DE *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. *in situ* Y SU GESTIÓN *ex situ*

JOSÉ LUIS SALINAS MORALES

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2023



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Rendimiento y calidad de semilla de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. *in situ* y su gestión *ex situ***, realizada por el estudiante: **José Luis Salinas Morales**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS  
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA

\_\_\_\_\_  
DRA. CECILIA BEATRIZ PEÑA VALDIVIA

ASESOR

\_\_\_\_\_  
DR. CARLOS TREJO LÓPEZ

ASESOR

\_\_\_\_\_  
DR. DANIEL PADILLA CHACÓN

ASESORA

\_\_\_\_\_  
DRA. MONSERRAT VÁZQUEZ SÁNCHEZ

ASESOR

\_\_\_\_\_  
DR. CRISTIAN LÓPEZ PALACIOS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, marzo de 2023

**RENDIMIENTO Y CALIDAD DE SEMILLA DE *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. *in situ* Y SU GESTIÓN *ex situ***

**José Luis Salinas Morales, D.C.  
Colegio de Postgraduados, 2023**

**RESUMEN**

Las poblaciones silvestres de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. (Chipilín) son fuente de follaje joven y flores que se usan en la alimentación y herbolaria desde tiempos prehispánicos. El interés por el consumo y producción agrícola de Chipilín es creciente en los últimos años; por lo que, para su cultivo es necesaria semilla que actualmente sólo se encuentra en esas poblaciones. El objetivo de esta investigación fue evaluar el rendimiento y calidad de semilla de *C. longirostrata in situ* y su gestión *ex situ*. La hipótesis fue que las poblaciones silvestres son fuente de semilla que permite el cultivo y manejo agrícola de las plantas, para el consumo humano, en invernadero. Se demostró que independientemente del ambiente silvestre, las plantas producen miles de semillas con la calidad apropiada para el cultivo de plantas saludables y adecuadas para el manejo agrícola, para incrementar significativamente la producción de follaje con calidad potencial para el consumo humano.

**Palabras clave:** Chipilín, componentes del rendimiento, follaje, inflorescencias, metabolismo especializado, reguladores del crecimiento, semilla.

**YIELD AND SEED QUALITY OF *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. *in situ* AND ITS  
*ex situ* MANAGEMENT**

**José Luis Salinas Morales, D.C.  
Colegio de Postgraduados, 2023**

**ABSTRACT**

Wild populations of *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. (Chipilín) are a source of young foliage and flowers that have been used in food and herbal medicine since pre-Hispanic times. Interest in the consumption and agricultural production of Chipilín has been growing in recent years; therefore, for its cultivation, seed that is currently only found in those populations is necessary. The objective of this research was to evaluate the yield and quality of seed of *C. longirostrata in situ* and its *ex situ* management. The hypothesis was that wild populations are a source of seed that allows the cultivation and agricultural management in greenhouses of plants for human consumption. It was shown that regardless of the wild environment, the plants produce thousands of seeds, with adequate quality for the cultivation of healthy plants and suitable for agricultural management, to significantly increase the production of foliage with potential quality for human consumption.

**Keywords:** Chipilín, yield components, foliage, inflorescences, specialized metabolism, growth regulators, seed.

## **AGRADECIMIENTOS**

La presente tesis doctoral, es un esfuerzo en el cual, de forma directa e indirecta, participaron varias personas leyendo, corrigiendo, opinando, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y de felicidad, por lo cual estoy muy agradecido con ellos, porque sin su valiosa aportación no hubiera sido posible este trabajo.

Primero y, antes que nada, doy infinitamente gracias al pueblo mexicano, que por medio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) me brindo el financiamiento para realizar mis estudios de posgrado.

Agradezco al Colegio de Postgraduados (COLPOS), Campus Montecillo y al Postgrado en Botánica que me brindo la oportunidad de formar parte de esta gran institución, a sus profesores, al personal admirativo y trabajadores, por el apoyo brindado durante mis estudios y por haber contribuido en mi formación académica.

Estoy muy agradecido con la Dra. Cecilia B. Peña Valdivia, mi consejera, por la dirección de este tema de investigación, por creer en mí, por las correcciones, comentarios, sugerencias, tiempo y paciencia, cuya valiosa colaboración hizo posible la realización de este trabajo.

A los asesores que conformaron el consejo particular: Dr. Carlos Trejo López, Dr. Cristian López Palacios, Dr. Daniel Padilla Chacón, y a la Dra. Monserrat Vázquez Sánchez, quienes me orientaron en la planeación y conducción del trabajo de investigación, su apoyo invaluable, tiempo y acertados comentarios para mejorar esta tesis.

A los sinodales: Dr. Ebandro Uscanga-Mortera y al Dr. David Martínez Moreno, por enriquecer el trabajo realizado con sus valiosos aportes, comentarios y observaciones.

Agradezco hoy y siempre a mi familia, madre, hermana, esposa e hijo, por darme su apoyo moral en todo momento y no permitir que yo renunciara a los estudios de doctorado, incitándome a seguir sin importar las adversidades que se me presentaron.

Finalmente, a mis amigos, por los gratos momentos que hemos pasado, su amistad y buenos consejos.

## **DEDICATORIA**

Dedico el presente manuscrito a las familias campesinas del municipio de Ometepec, Guerrero, por compartir su tiempo y experiencia que fue piedra angular en el desarrollo del trabajo de investigación. Pienso que nos seguiremos encontrando en el camino, pues esto apenas comienza y existen muchas cosas por hacer en el campo mexicano, donde el conocimiento empírico de las mujeres y hombres campesinos, permite preservar nuestras raíces, y junto con el conocimiento científico se puede lograr la soberanía alimentaria.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>v</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE CUADROS.....</b>	<b>xxii</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>6</b>
Generalidades e importancia del género <i>Crotalaria</i> .....	6
Clasificación taxonómica de <i>Crotalaria longirostrata</i> (chipilín) .....	7
Descripción botánica.....	8
Distribución geográfica en México.....	9
Importancia del chipilín .....	10
Alimentaria y nutrimental.....	10
Económica .....	13
Herbolaria .....	13
Importancia para la agricultura .....	14
Tolerancia a sequía y remedidor de suelos .....	14
Control biológico.....	14
Producción de biomasa.....	15
Métodos agronómicos para la alteración del crecimiento de las plantas .....	15
Poda dirigida.....	15

Reguladores del crecimiento .....	16
Fisiología de la semilla.....	21
<b>CAPÍTULO I. COMPONENTES DEL RENDIMIENTO DE <i>Crotalaria</i></b>	
<b><i>longirostrata</i> Hook. &amp; Arn. EN GUERRERO, MÉXICO .....</b>	<b>24</b>
<b>1.1 RESUMEN .....</b>	<b>24</b>
<b>1.2 ABSTRACT .....</b>	<b>26</b>
<b>1.3 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>28</b>
<b>1.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>1.4.1 Localidades de recolecta e identificación del material vegetal.....</b>	<b>33</b>
<b>1.4.2 Variables evaluadas.....</b>	<b>34</b>
<b>1.4.2.1 Plantas.....</b>	<b>34</b>
<b>1.4.2.2 Suelo.....</b>	<b>35</b>
<b>1.4.3 Diseño experimental y análisis estadístico.....</b>	<b>37</b>
<b>1.5 RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>1.5.1 Componentes del rendimiento.....</b>	<b>38</b>
<b>1.5.1.1 Número de ramas.....</b>	<b>38</b>
<b>1.5.1.2 Número de racimos.....</b>	<b>38</b>
<b>1.5.1.3 Número de frutos .....</b>	<b>38</b>
<b>1.5.1.4 Rendimiento de semillas.....</b>	<b>41</b>
<b>1.5.1.5 Longitud, diámetro y biomasa de los frutos.....</b>	<b>43</b>
<b>1.5.1.6 Análisis de componentes principales.....</b>	<b>46</b>
<b>1.5.2 Características del suelo.....</b>	<b>47</b>
<b>1.6 DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>

<b>1.7 CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>CAPITULO II. CALIDAD FÍSICA Y FISIOLÓGICA DE LA SEMILLA DE</b>	
<b><i>Crotalaria longirostrata</i> Hook. &amp; Arn. (CHIPILÍN) RECOLECTADAS</b>	
<b>EN GUERRERO, MÉXICO .....</b>	<b>58</b>
<b>2.1 RESUMEN .....</b>	<b>58</b>
<b>2.2 ABSTRACT .....</b>	<b>60</b>
<b>2.3 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>61</b>
<b>2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
<b>2.4.1 Material vegetal .....</b>	<b>63</b>
<b>2.4.2 Evaluaciones.....</b>	<b>63</b>
<b>2.4.2.1 Determinación de humedad .....</b>	<b>63</b>
<b>2.4.2.2 Determinación de las dimensiones y la biomasa de las semillas .....</b>	<b>64</b>
<b>2.4.2.3 Evaluación de la viabilidad y el vigor de los embriones .....</b>	<b>64</b>
<b>2.4.2.4 Evaluación de la germinación de las semillas.....</b>	<b>65</b>
<b>2.4.2.5 Prueba de envejecimiento acelerado de las semillas.....</b>	<b>66</b>
<b>2.4.2.6 Evaluación de la emergencia de las plántulas .....</b>	<b>66</b>
<b>2.4.3 Análisis estadístico.....</b>	<b>66</b>
<b>2.5 RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
<b>2.5.1 Calidad física.....</b>	<b>68</b>
<b>2.5.2 Calidad fisiológica .....</b>	<b>70</b>
<b>2.5.2.1 Viabilidad y vigor .....</b>	<b>70</b>
<b>2.5.2.2 Efecto de la temperatura en la germinación de las semillas .....</b>	<b>71</b>

2.5.2.3 Efecto de la escarificación mecánica en la germinación de las semillas .....	76
2.5.2.4 Efecto del envejecimiento acelerado de las semillas en su germinación .....	77
2.5.2.5 Emergencia de las plántulas .....	82
2.6 DISCUSIÓN.....	84
2.7 CONCLUSIONES.....	90
 <b>CAPITULO III. EFECTO DE LA PODA Y DE CITOCININA EXÓGENA EN LA PRODUCCIÓN DE FOLLAJE DE PLANTAS DE <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook. &amp; Arn. CULTIVADAS EN INVERNADERO.....</b>	
<b>3.1 RESUMEN.....</b>	<b>92</b>
<b>3.2 ABSTRACT .....</b>	<b>94</b>
<b>3.3 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>96</b>
<b>3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>100</b>
3.4.1 Sitio del estudio .....	100
3.4.2 Material para el estudio .....	100
3.4.3 Tratamientos y diseño experimental.....	101
3.4.4 Riego y fertilización.....	102
3.4.5 Variables evaluadas.....	103
3.4.6 Análisis estadístico.....	103
<b>3.5 RESULTADOS.....</b>	<b>105</b>
3.5.1 Número de ramas .....	105
3.5.2 Número de hojas.....	105

3.5.3 Biomasa fresca de foliolos .....	105
3.5.4 Biomasa fresca de ramas.....	107
3.5.5 Área foliar .....	108
3.5.6 Tasa absoluta de crecimiento (TCA) .....	110
3.5.7 Tasa de asimilación neta .....	112
3.6 DISCUSIÓN.....	114
3.7 CONCLUSIONES.....	118
 <b>CAPÍTULO IV. CONTRASTE EN EL CONTENIDO DE METABOLITOS</b>	
<b>PRIMARIOS Y DEL METABOLISMO ESPECIALIZADO EN</b>	
<b>PLANTAS DE <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook. &amp; Arn. RECOLECTADAS</b>	
<b><i>in situ</i> Y CULTIVADA EN INVERNADERO .....</b>	<b>119</b>
 4.1 RESUMEN.....	 119
4.2 ABSTRACT .....	121
4.3 INTRODUCCIÓN.....	122
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	125
4.4.1 Material vegetal .....	125
4.4.2 Análisis del material vegetal .....	127
4.4.2.1 Cuantificación de materia seca, minerales (cenizas) y metabolitos	
primarios.....	127
4.4.2.2 Identificación cualitativa y cuantificación de productos del	
metabolismo especializado .....	127
4.4.3. Análisis de suelo.....	128
4.4.4. Diseño experimental y análisis estadístico.....	128

<b>4.5 RESULTADOS</b> .....	130
<b>4.5.1 Foliolos</b> .....	130
<b>4.5.2 Flores</b> .....	138
<b>4.5.3 Ramas</b> .....	145
<b>4.5.4 Suelo</b> .....	148
<b>4.6 DISCUSIÓN</b> .....	151
<b>4.7. CONCLUSIONES</b> .....	160
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>161</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	<b>168</b>
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>170</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribución de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. en México (coordenadas tomadas del herbario MEXU). Cartografía de INEGI. Continuo Nacional del Conjunto de Datos Geográficos de la carta de climas Escala 1:1 000 000, serie I. .... 10
- Figura 1.1.** Estructuras de las plantas de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. recolectadas en Las Vigas, Cabecera municipal “Ometepec” y Llano Grande de los Hilarios Igualapa, en Guerrero, México. .... 34
- Figura 1.2.** Promedio del número y distribución de racimos frutales y de frutos en las ramas, en sentido acrópeto, sobre el tallo de plantas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en Guerrero, México. Localidades MAG: con manejo agrícola y ganadero circundante (A y D), AU: con actividad urbana circundante (B y E) y SAA: sin actividad antrópica circundante (C y F). .... 40
- Figura 1.3.** Frecuencia del número de semillas por fruto en plantas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en Guerrero, México. Localidades MAG: con manejo agrícola y ganadero circundante, AU: con actividad urbana circundante y SAA: sin actividad antrópica circundante. .... 42
- Figura 1.4.** Promedio del número y distribución de semillas en las ramas, en dirección acrópeta, sobre el tallo de plantas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en localidades de Guerrero, México. Localidades MAG: con manejo agrícola y ganadero circundante, AU: con actividad urbana circundante y SAA: sin actividad antrópica circundante. .... 43

<b>Figura 1.5.</b> Promedio (+ <i>E.E.</i> ) de las dimensiones de los frutos (A), de su biomasa y la biomasa de sus semillas y valvas (B) por planta de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn., de la localidad Las Vigas (con manejo agrícola aledaño), Guerrero, México.....	44
<b>Figura 1.6.</b> Frecuencia del diámetro (A) y de la longitud (B) de los frutos de plantas de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn. recolectadas en Las Vigas, Guerrero, México (localidad con manejo agrícola aledaño). .....	45
<b>Figura 1.7.</b> Distribución de la frecuencia de la biomasa de los frutos (A), de sus valvas (B) y semillas (C) en las ramas a lo largo del tallo, en dirección acrópeta, de plantas de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn. recolectadas en Las Vigas, Guerrero, México (localidad con manejo agrícola aledaño).....	46
<b>Figura 1.8.</b> Ordenación de los componentes principales (PC) 1 y 2 de plantas de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn. recolectadas en tres localidades de Guerrero, México, según los componentes del rendimiento (Rc. R: racimos por rama, F. R: frutos por rama; F. Rc: frutos por racimo; S. R: semillas por rama; S. Rc: semillas por racimo; S. F: semillas por fruto). .....	49
<b>Figura 1.9.</b> Climogramas basados en precipitación promedio (barras) y temperatura promedio mínima (círculos negros), media (círculos verdes) y máxima (círculos rojos) en Las Vigas (A), Ometepec (B) y Llano Grande de los Hilarios Igualapa (C), Guerrero, México. Cada barra y círculo representa los datos promedio mensuales (1: enero... 12: diciembre) durante un período de seis décadas, de 1950 a 2010 (CONAGUA, 2022).....	53

<b>Figura 2.1.</b> Frecuencia de la longitud (A) y anchura (B) de semillas de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn. recolectadas en localidades con: actividad urbana (barras y línea roja), manejo agrícola y ganadero (barras y línea azul) y sin actividad antrópica (barras y línea verde) de Ometepepec, Guerrero, México (otros colores de algunas barras son resultado del traslape. ....	69
<b>Figura 2.2.</b> Frecuencia del grosor (A) y de la biomasa (B) de las semillas de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn. recolectadas en localidades con: actividad urbana (barras y línea roja), manejo agrícola y ganadero (barras y línea azul) y sin actividad antrópica (barras y línea verde) de Ometepepec, Guerrero, México (otros colores de algunas barras son resultado del traslape). ....	70
<b>Figura 2.3.</b> Embriones de semillas de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn. teñidos con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio, viables con vigor alto (1) y poco o no viables (2).....	71
<b>Figura 2.4.</b> Germinación acumulada (+ E.E.), dependiente de la temperatura 25, 30, 35,40 y 45 ° C (círculos llenos, cuadros, triángulos o rombos, respectivamente), durante la germinación, de semillas de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn. recolectadas en localidades con actividad urbana (AU), con manejo agrícola y ganadero (MAG) y sin actividad antrópica (SAA) de Ometepepec, Guerrero, México. ....	75
<b>Figura 2.5.</b> Efecto de la escarificación mecánica en la germinación (+ E.E.) (cuadros), con 25 °C y oscuridad, de semillas intactas (círculos llenos) de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn. recolectadas en localidades con actividad urbana	

(A), con manejo agrícola y ganadero (B) y sin actividad antrópica (C) de Ometepec, Guerrero, México.....	78
<b>Figura 2.6.</b> Germinación a 25 °C y oscuridad de semillas, sin envejecimiento acelerado (círculos vacíos) o con envejecimiento acelerado durante 24, 48, 72 o 96 h (círculos llenos, cuadros, triángulos o rombos, respectivamente), de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn. recolectadas en Guerrero, México. Localidad con actividad urbana (A), con manejo agrícola y ganadero (B) y sin actividad antrópica (C). .....	79
<b>Figura 2.7.</b> Porcentaje de emergencia (+ E.E.) de plantas, en el sustrato y condiciones de invernadero, a partir de semillas escarificadas, recolectadas en localidades con actividad urbana (círculos), con manejo agrícola y ganadero (cuadros) y sin actividad antrópica (triángulos) de Guerrero, México. La emergencia (+ E.E.) de plántulas de semillas sin escarificar, de una localidad con manejo agrícola y ganadero (rombos), también se incluye. ....	83
<b>Figura 3.1.</b> Humedad relativa (barras azules), temperaturas promedio mínima (círculos azules), media (círculos verdes) y máxima (círculos rojos) mensual en el invernadero en Montecillos, Texcoco Estado de México, hasta el inicio de floración de plantas de <i>C. longirostrata</i> . Mes 2: febrero, ..., 10: octubre.....	102
<b>Figura 3.2.</b> Número de ramas + E.E. por planta de <i>Crotalaria longirostrata</i> durante 60 días de crecimiento en invernadero ( $n = 4$ ), el asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa entre dos o más tratamientos por fecha ( $\alpha = 0.05$ )......	106

<b>Figura 3.3.</b> Número hojas + <i>E.E.</i> por planta de <i>Crotalaria longirostrata</i> durante 60 días de crecimiento en invernadero ( $n = 4$ ), el asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa entre dos o más tratamientos por fecha ( $\alpha = 0.05$ ).....	107
<b>Figura 3.4.</b> Biomasa de folíolos + <i>E.E.</i> por planta de <i>Crotalaria longirostrata</i> durante 60 días de crecimiento en invernadero ( $n = 4$ ), el asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa entre dos o más tratamientos por fecha ( $\alpha = 0.05$ ).....	108
<b>Figura 3.5.</b> Biomasa fresca de ramas + <i>E.E.</i> por planta de <i>Crotalaria longirostrata</i> durante 60 días de crecimiento en invernadero ( $n = 4$ ), el asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa entre dos o más tratamientos por fecha ( $\alpha = 0.05$ ).....	109
<b>Figura 3.6.</b> Área foliar + <i>E.E.</i> por planta de <i>Crotalaria longirostrata</i> durante 60 días de crecimiento en invernadero ( $n = 4$ ), el asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa entre dos o más tratamientos por fecha ( $\alpha = 0.05$ ).....	110
<b>Figura 3.7.</b> Tasa absoluta de crecimiento + <i>E.E.</i> de <i>Crotalaria longirostrata</i> durante 60 días de crecimiento en invernadero ( $n = 4$ ) con tratamientos diversos.....	111
<b>Figura 3.8.</b> Tasa de asimilación neta + <i>E.E.</i> de <i>Crotalaria longirostrata</i> durante 60 días de crecimiento en invernadero ( $n = 4$ ) con tratamientos diversos. ....	112
<b>Figura 4.1.</b> Precipitación media y humedad a capacidad de campo (barras azules), temperaturas promedio mínima (círculos azules), media (círculos verdes) y máxima (círculos rojos) mensual en (A) Las Vigas, Ometepe, Guerrero,	

México, y (B) en el invernadero en Montecillos, Texcoco, Estado de México, durante el ciclo de crecimiento de plantas de *C. longirostrata*. 1: enero, ..., 12: diciembre..... 126

**Figura 4.2.** Proteína total (A), glucosa (B), fructosa (C) y sacarosa (D) en folíolos de *C. longirostrata* recolectados *in situ*, las Vigas, Ometepec, Guerrero, México y de folíolos de plantas cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. Cada barra representa el promedio de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. .... 132

**Figura 4.3.** Concentración de almidón (A), hemicelulosa (B), fibra detergente ácido (C) y fibra detergente neutro (D) en folíolos de *C. longirostrata* recolectados *in situ*, las Vigas, Ometepec, Guerrero, México, y en folíolos de plantas cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. Cada barra representa el promedio de cuatro Repeticiones  $\pm$  error estándar. .... 133

**Figura 4.4.** Concentración de fenoles (A), flavonoides (B), taninos (C), saponinas (D) y terpenos (E) en folíolos de *C. longirostrata* recolectados *in situ*, las Vigas, Ometepec, Guerrero, México, y de folíolos de plantas cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. El asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa de acuerdo con la prueba t-Student ( $\alpha = 0.05$ ). Cada barra representa el promedio de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. .... 135

**Figura 4.5.** Coeficientes de correlación ( $\rho$ ) de Spearman del contenido de minerales (Cz) y metabolitos en folíolos de *C. longirostrata* cosechados de plantas (A) *in situ*, las Vigas, Ometepec, Guerrero, México y (B) cultivadas en invernadero,

Montecillo, Texcoco, Estado de México. El color de las elipses representa la intensidad de la correlación ( $\alpha=0.05$ ). Líneas diagonales o recuadros vacíos indican correlación máxima o mínima. Glu: glucosa, Fruc: fructosa, Sac: sacarosa, Adn: almidón, PT: proteína total, FDN: fibra detergente neutro, FDA: fibra detergente ácido, HEM: hemicelulosa, Fen: fenoles, Fvl: flavonoides, Sap: saponinas, Tan: taninos, Ter: terpenos. .... 136

**Figura 4.6.** Concentración de proteína total (A), glucosa (B), fructosa (C) y sacarosa (D) en flores de *C. longirostrata* recolectados *in situ*, las Vigas, Ometepec, Guerrero, México y de plantas cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. El asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa de acuerdo con la prueba t-Student ( $\alpha = 0.05$ ). Cada barra representa el promedio de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. .... 139

**Figura 4.7.** Concentración de almidón (A), hemicelulosa (B), fibra detergente ácido (C) y fibra detergente neutro (D) en flores de *C. longirostrata* recolectados *in situ*, las Vigas, Ometepec, Guerrero, México, y de plantas cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. El asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa de acuerdo con la prueba t-Student ( $\alpha = 0.05$ ). Cada barra representa el promedio de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. .... 140

**Figura 4.8.** Concentración de fenoles (A), flavonoides (B), taninos (C), saponinas (D) y terpenos (E) en flores de *C. longirostrata* recolectados *in situ*, las Vigas, Ometepec, Guerrero, México, y de plantas cultivadas en invernadero,

Montecillo, Texcoco, Estado de México. El asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa de acuerdo con la prueba t-Student ( $\alpha = 0.05$ ). Cada barra representa el promedio de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar. .... 143

**Figura 4.9.** Coeficientes de correlación ( $\rho$ ) de Spearman del contenido de minerales (Cz) y metabolitos en flores de *C. longirostrata* de plantas (A) *in situ*, las Vigas, Ometepec, Guerrero, México y (B) cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. El color de las elipses representa la intensidad de la correlación ( $\alpha = 0.05$ ). Líneas diagonales o recuadros vacíos indican correlación máxima o mínima. Glu: glucosa, Fruc: fructosa, Sac: sacarosa, Adn: almidón, PT: proteína total, FDN: fibra detergente neutro, FDA: fibra detergente ácido, HEM: hemicelulosa, Fen: fenoles, Fvl: flavonoides, Sap: saponinas, Tan: taninos, Ter: terpenos. .... 144

**Figura 4.10.** Coeficientes de correlación ( $\rho$ ) de Spearman del contenido de minerales (Cz) y metabolitos en ramas de *C. longirostrata* de plantas (A) *in situ*, las Vigas, Ometepec, Guerrero, México y (B) cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. El color de las elipses representa la intensidad de la correlación ( $\alpha = 0.05$ ). Líneas diagonales o recuadros vacíos indican correlación máxima o mínima. Glu: glucosa, Fruc: fructosa, Sac: sacarosa, Adn: almidón, Fen: fenoles, Fvl: flavonoides, Sap: saponinas, Tan: taninos, Ter: terpenos. .... 148

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook. & Arn. ....	8
<b>Cuadro 2.</b> Composición de Chipilín ( <i>C. longirostrata</i> ), espinaca ( <i>Spinaca oleracea</i> L.), acelga ( <i>Beta vulgaris</i> var cicla) y hierba mora ( <i>Solanum</i> sp.), en 100 g de tejido fresco*.....	12
<b>Cuadro 3.</b> Clasificación de los principales reguladores de crecimiento. ....	18
<b>Cuadro 1.1.</b> Localidades y características de los sitios de muestreo de <i>Crotalaria</i> <i>longirostrata</i> Hook. & Arn. en Guerrero, México (CONAGUA, 2020; García, 2004). ....	36
<b>Cuadro 1.2.</b> Componentes del rendimiento (promedio $\pm$ E.E.) de plantas de <i>Crotalaria</i> <i>longirostrata</i> Hook & Arn. recolectadas en tres localidades de Guerrero, México. ....	39
<b>Cuadro 1.3.</b> Coeficientes de correlación de Pearson entre las dimensiones y la biomasa de los frutos de plantas de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn. recolectadas en Las Vigas, Guerrero, México (localidad con manejo agrícola aledaño). ....	47
<b>Cuadro 1.4.</b> Valores propios y proporción de la varianza para los primeros componentes principales generados a partir de los componentes del rendimiento de plantas de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn. recolectadas en tres localidades de Guerrero, México. ....	48
<b>Cuadro 1.5.</b> Características físicas y químicas del suelo de tres localidades de Guerrero, México. ....	51

<b>Cuadro 2.1.</b> Achura, grosor, longitud, biomasa ( $\pm$ E.E.) y humedad de semillas de chipilín ( <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn.) recolectadas en Ometepec, Guerrero, México. ....	68
<b>Cuadro 2.2.</b> Porcentaje ( $\pm$ E.E.) de viabilidad de embriones y germinación total (25 °C y oscuridad constante) de semillas de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn., recolectadas en Ometepec, Guerrero, México. ....	71
<b>Cuadro 2.3.</b> Ecuaciones de las curvas ajustadas de germinación de semillas sin escarificar, de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn., recolectadas en Ometepec, Guerrero, México.....	74
<b>Cuadro 2.4.</b> Efecto de la temperatura en la germinación y tasa de germinación de semillas, sin escarificar, de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn., recolectadas en Ometepec, Guerrero, México. ....	76
<b>Cuadro 2.5.</b> Ecuaciones de las curvas ajustadas de germinación, con 25 °C y en oscuridad, de semillas, con envejecimiento acelerado, de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn., recolectadas en Ometepec, Guerrero, México.....	80
<b>Cuadro 2.6.</b> Efecto del tiempo en envejecimiento acelerado (EA; con 41 °C, H.R. de 100 % y oscuridad) en la germinación de semillas de <i>Crotalaria longirostrata</i> Hook & Arn., recolectadas en Guerrero, México. ....	81
<b>Cuadro 3.1.</b> Tasa absoluta de crecimiento del cultivo (TCA) y de asimilación neta (TAN) de plantas de <i>Crotalaria longirostrata</i> , en invernadero, en función de la poda y la hormona de crecimiento (BAP). ....	113
<b>Cuadro 4.1.</b> Contenido de biomasa seca y concentración de minerales (g/100 g $\pm$ E.E.) de folíolos y flores cosechados de plantas <i>C. longirostrata</i> en Las Vigas,	

Ometepec, Guerrero, México, y de plantas cultivadas en invernadero en Montecillo, Texcoco, Estado de México. ....	130
<b>Cuadro 4.2.</b> Presencia, con abundancia relativa, o ausencia <sup>¶</sup> de grupos químicos del metabolismo especializado de folíolos, flores y ramas de plantas de <i>C. longirostrata in situ</i> y cultivadas en invernadero.....	134
<b>Cuadro 4.3.</b> Concentración de azúcares solubles, almidón y de los grupos de compuestos del metabolismo especializado (g/100 g) en ramas de <i>C. longirostrata</i> recolectados <i>in situ</i> , las Vigas, Ometepec, Guerrero, México, o de plantas cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. ....	146
<b>Cuadro 4.4.</b> Características físicas y químicas del suelo de la localidad Las Vigas, Guerrero, México y de suelo agrícola de Montecillos, Estado de México. ....	150

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La biodiversidad cultural y de recursos naturales entre las etnias contribuyen a la gestión de los recursos biológicos, a la alimentación y al desarrollo agrícola (Basurto-Peña, 2011). El uso de los recursos biológicos incluye tradición y cultura, y depende del ámbito social y económico. En el contexto tradicional, el uso de las plantas es diverso. En México se han registrado más de 15,306 especies vegetales útiles (Villaseñor, 2016); estas están agrupadas en categorías antropogénicas y entre las que destacan medicinales, comestibles y ornamentales (Basurto-Peña, 1998). En ese registro existen 500 especies silvestres consideradas como quelites y son alternativa para la alimentación humana (Bye, 2000). Algunas de ellas son verdolaga (*Portulaca oleracea* L.), quintoniles o amarantos (*Amaranthus* spp.), epazote (*Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants), pápalo (*Porophyllum ruderale* subsp. *macrocephalum*), quelite cenizo (*Chenopodium berlandieri* L.), yerba mora (*Solanum americanum* Mill), hierba mora (*Solanum nigrescens* Mart. & Gal), alache (*Anoda cristata* (L.) Schltldl), jaltomate (*Jaltomata procumbens* (Cav.) J. L. Gentry) y los chepiles (*Crotalaria* spp.) que, a la vez, incluyen a *C. incana* L., *C. pumila* Ort y *C. longirostrata* Hook. & Arn (Basurto-Peña, 2011). Aunque, la FAO (1993, 2018) ha señalado a la última como la única especie comestible del género *Crotalaria*. La característica común que comparte el grupo de los quelites es que, en alguna etapa de desarrollo, las hojas, las ramas, los frutos o las flores tiernas se utilizan como verduras (Bye, 2000). Los quelites crecen de manera espontánea en los campos de cultivo y pueden complementar la alimentación de humanos por que proporcionan vitaminas, minerales, fibra y proteínas; además, frecuentemente se comercializan. Este es el caso de las hojas de *C. longirostrata*, conocida como “Chepil” o “Chipilín” (Castro-Lara *et al.*, 2014).

*Crotalaria longirostrata* es una leguminosa, sus hojas tiernas son alimento para humanos desde tiempos prehispánicos y otros usos documentados son como abono verde para fijar nitrógeno atmosférico, control de nematodos en el suelo (Desaeger y Rao, 1999; Wang *et al.*, 2002), medicinal, ornamental (Arellano, 1985; Arias *et al.*, 2003), forraje para animales (Arias *et al.*, 2003), y control microbiano (; Miranda-Granados *et al.*, 2018; Cruz-Rodríguez *et al.*, 2020).

Las plantas del género *Crotalaria* presentan crecimiento determinado, con floración de varios meses y desarrollo de semillas asincrónicos (Crusciol y Soratto, 2009); por lo que, en una misma planta se presentan semillas en estadios diferentes de maduración y color de su cubierta seminal variable (Pascualides y Planchuelo, 2007; Beltramini y Pascualides, 2017). Actualmente no se han documentado los componentes del rendimiento y el rendimiento de semilla *in situ*, tampoco se han evaluado los componentes del rendimiento *in situ*, que pueden ser el antecedente para la descripción del potencial agronómico de Chipilín.

Las semillas del género *Crotalaria* toleran entre 25 y 40 °C durante la germinación, la que puede alcanzar 50% (González *et al.*, 2008). Las plantas pueden crecer en suelos con potencial de agua de -0.4 MPa y la raíz se desarrolla en suelos compactados (Ferrarotto y Otaiza, 2014). Las plantas se adaptan a climas cálidos, *C. ochroleuca* y *C. juncea* presentan cierta tolerancia a la sequía y crecen en varios tipos de suelo (Sarwatt y Mkiwa, 1988; Wang *et al.*, 2002). La calidad fisiológica de la semilla, que incluye el vigor y la germinación, debe asegurar el éxito del cultivo (ISTA, 2005). La calidad fisiológica de la semilla depende de factores intrínsecos y ambientales, como la temperatura, la luz, la salinidad del suelo, el pH y la humedad. La semilla de *C. longirostrata* se ha descrito parcialmente y se desconoce la temperatura óptima de germinación, la respuesta al almacenamiento inadecuado y emergencia de las plantas en respuesta a la siembra. Un objetivo de

este estudio fue localizar poblaciones silvestres de *C. longirostrata*, recolectar sus semillas y otras estructuras de las plantas para evaluar los componentes del rendimiento. Una hipótesis del estudio fue que las plantas de poblaciones *in situ* responden al ambiente de crecimiento; con lo que, los componentes del rendimiento, incluido el rendimiento de semilla, los definen los factores climáticos y las características edáficas del sitio de crecimiento.

La calidad de las semillas se determina con base en aspectos: físicos, fisiológicos, genéticos y fitosanitarios (ISTA, 2005). En especies que no se cultivan también se toman en cuenta aspectos ecológicos y ambientales (Leishman *et al.*, 2000), los de su propagación, dispersión, germinación, emergencia y respuesta al almacenamiento (Ayala-Cordero *et al.*, 2004). El efecto del ambiente *in situ* en el rendimiento y calidad fisiológica de las semillas de *C. longirostrata* no se ha documentado; por lo que, otro objetivo en este estudio fue evaluar la calidad física y fisiológica de las semillas de tres poblaciones silvestres de ambientes parcialmente diferentes. La hipótesis fue que las poblaciones silvestres, independientemente del ambiente en el que crecen, tienen semillas suficientes con embriones viables y vigorosos que permiten caracterizar la germinación y los parámetros que la definen.

En el suroeste de México, Chiapas, Tabasco, Veracruz, Oaxaca y Guerrero los campesinos cosechan las plantas de Chipilín cuando tiene entre 80 y 90 cm de altura, en etapa vegetativa, etapa en la cual tiene más hojas jóvenes. Ellos la venden en manojos en los mercados locales (Linares y Bye, 2015). Para que *C. longirostrata* se establezca como un cultivo agronómico es indispensable recolectar sus semillas y evaluar su calidad física y fisiológica, determinar las condiciones de cultivo que permitan la obtención de suficiente follaje y que garanticen la rentabilidad del cultivo. El incremento de follaje se ha logrado en algunas especies como *Amaranthus cruentus* L,

*Amaranthus hypochondriacus* L (Martínez *et al.*, 1999) y *Crotalaria vitellina* Ker Gawl (Hernández, 1997) mediante poda para romper la dominancia apical, y la aplicación de reguladores de crecimiento, como citoquinina, giberelinas y auxinas, exógenos en plantas de *Camellia sinensis* L Kuntze, *Allium sativum* L y *Medicago sativa* L (Zhang *et al.*, 2018; El-Mesirry y Radi, 2019; Sosnowsk *et al.*, 2019). En el primer caso, la decapitación o la eliminación de la parte epigea de la planta generó 50 y 14 % más de ramas y hojas, en el segundo caso la aplicación de reguladores de crecimiento ácido indol-3-butírico (IBA), ácido naftaleno-1-acético (NAA) y 6-bencilaminopurina (BAP) en número de hojas y biomasa fresca aumentó 43 %. Estos cambios en la morfología de las plantas de uso alimenticio generan beneficios a los productores comerciales. Las semillas de Chipilín no se comercializan, por lo que y las poblaciones silvestres pueden ser la fuente de semillas para la siembra. Por lo anterior, otro objetivo de este estudio fue determinar las condiciones de cultivo, a partir de semilla recolectada *in situ*, de *C. longirostrata* en invernadero y métodos mecánicos y químicos para incrementar el follaje, de plantas en etapa vegetativa, que garantice la rentabilidad del cultivo. La hipótesis fue que, debido a que las poblaciones silvestres de esta especie crecen y se desarrollan en ambientes diversos, dentro de ciertos límites extremos, las semillas recolectadas *in situ* generarán plantas saludables en invernadero y responderán a las condiciones ambientales y manejo del cultivo.

Las hojas y otras estructuras como el tallo y la raíz de *C. longirostrata* son ricos en productos del metabolismo especializado, incluidos los compuestos fenólicos, flavonoides, y saponinas, cumarinas, taninos, antraquinonas, antranas y alcaloides (Arias *et al.*, 2003; Bibi *et al.*, 2015; Cruz-Rodríguez *et al.*, 2017). El consumo de las hojas de chipilín puede producir somnolencia en humanos debido a la presencia de algunos de esos compuestos del metabolismo especializado (Rodríguez-Campos *et al.*, 1998). El cambio de ambiente de crecimiento puede generar en las

plantas estrés y activar parcialmente el metabolismo especializado (Weng *et al.*, 2021). Por lo que, otro objetivo de este estudio fue cuantificar algunos compuestos del metabolismo primario, como azúcares solubles, almidón y proteína soluble, y los grupos del metabolismo especializado, *i.e.*, fenoles, polisacáridos estructurales (fibra y hemicelulosa), flavonoides, y saponinas en follaje y flores de las plantas *in situ* y de las cultivadas. La hipótesis fue que el cultivo en invernadero de plantas de *C. longirostrata* no genera estrés que active el metabolismo especializado, por lo que, esas plantas presentan concentraciones similares de compuestos del metabolismo primario y del especializado equivalente al de las plantas *in situ*.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Generalidades e importancia del género *Crotalaria*

La familia Fabaceae (Leguminosae) es la segunda familia más importante de las plantas cultivadas y sus parientes silvestres, después de la familia de las gramíneas o Poaceae que incluye a los cereales, aportan proteínas, carbohidratos y minerales a los humanos y animales. En la actualidad se reconocen 751 géneros y más de 20 000 especies con distribución cosmopolita (Lewis, 2013; LPWG 2013; Rzedowski *et al.*, 2016). El género *Crotalaria* incluye entre 600 y 700 especies, su distribución es mundial (Bernal, 1986), y crecen en regiones tropicales y subtropicales. Quinientas de esas especies son nativas de África y Madagascar, 79 son nativas de América, de las que 59 se han reportadas en EE.UU. y 21 se localizan en México. De estas 21 especies, ocho se han calificado como endémicas y nueve se ubican en el valle de Tehuacán-Cuicatlán (Soto-Estrada, 2004). El género *Crotalaria* está ampliamente distribuido en la región sur de México entre los 200 y 2600 metros sobre el nivel del mar. Las especies del género *Crotalaria* con importancia en la agricultura son *C. longirostrata* Hook. & Arn, *C. pumila* y *C. incana* (Basurto-Peña, 2011), las tres son silvestres, se presentan como maleza y en escala menor como cultivo.

Algunas especies del género *Crotalaria*, como *C. juncea* L., *C. pallida* Aiton., *C. brevidens* Benth., *C. purdieana* Senn, *C. retusa* L., *C. spectabilis* Roth, y *C. lanceolata* E. Mey, tienen aplicación como abono verde, ya que mejoran la fertilidad del suelo, incrementan la retención de nutrientes del suelo, controlan poblaciones de nematodos o son antimicrobianas (Burkart 1952; Bernal 1986; Kiruthiga *et al.*, 2014; Miranda-Granados *et al.*, 2018).

*Crotalaria longirostrata* se utiliza como alimento para humanos y animales, ya que es la única especie comestible del género *Crotalaria*; además, se utiliza con fines medicinales desde tiempos prehispánicos (Basurto-Peña, 2011; FAO, 2018). Las semillas y raíces de otras especies, como *C. pallida* Aiton y *C. spectabilis* Roth, son tóxicas para humanos y animales (Bernal 1986; Panda *et al.*, 2015). Este efecto se debe a la presencia de metabolitos secundarios (Asres *et al.*, 2004; Devendra *et al.*, 2012) como alcaloides, aminos, flavonoides, saponinas, cumarinas, lectinas y taninos (Arias *et al.*, 2003; Cruz-Rodríguez, *et al.*, 2017; Kumar *et al.* 2011), alcaloides de pirrolizidina y aminoácidos no proteicos, principalmente en sus semillas (Flores *et al.*, 2009; Wink, 2003).

### **Clasificación taxonómica de *Crotalaria longirostrata* (chipilín)**

El chipilín pertenece a la familia de la Fabaceae (Fabales) (Cuadro 1). *Crotalaria longirostrata* se conoce con nombres comunes diversos, que varían entre las regiones donde se consume. En Guatemala se le denomina Chipilín de caballo, Chipilín de zope o Chop; en El Salvador y Honduras se le conoce como Chipile y Chipilín y en México, además de Chipilín se le conoce como Chipile y cascabel de víbora (Basurto-Peña, 2011; Morton, 1994).

La palabra Chipilín es una derivación del Náhuatl que se interpreta como “alimento con que los enfermos tomarán fuerza” y del Tzotzil “Tsi-ipil-lli” que significa “hierba de la fuerza” (Rodríguez-Campos *et al.*, 1998; Standley y Steyermark, 1946). La derivación en Maya es “Chepil-Ix” y su significado es “Hojas de la Luna” (Macías, 2017).

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.

Familia	Sistema de Engler (1898)	Sistema de Cronquist (1981)	Sistema del APG III (2009)
Fabaceae	Leguminosae Rosales Rosineae	Fabales	Leguminosae, Fabales

Reino: Plantae  
Phylum: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Subclase: Rosidae  
Orden: Fabales  
Familia: Fabaceae  
Subfamilia: Faboideae o (Papilionoideae)  
Tribu: Crotalarieae  
Género: *Crotalaria*  
Especie: *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn

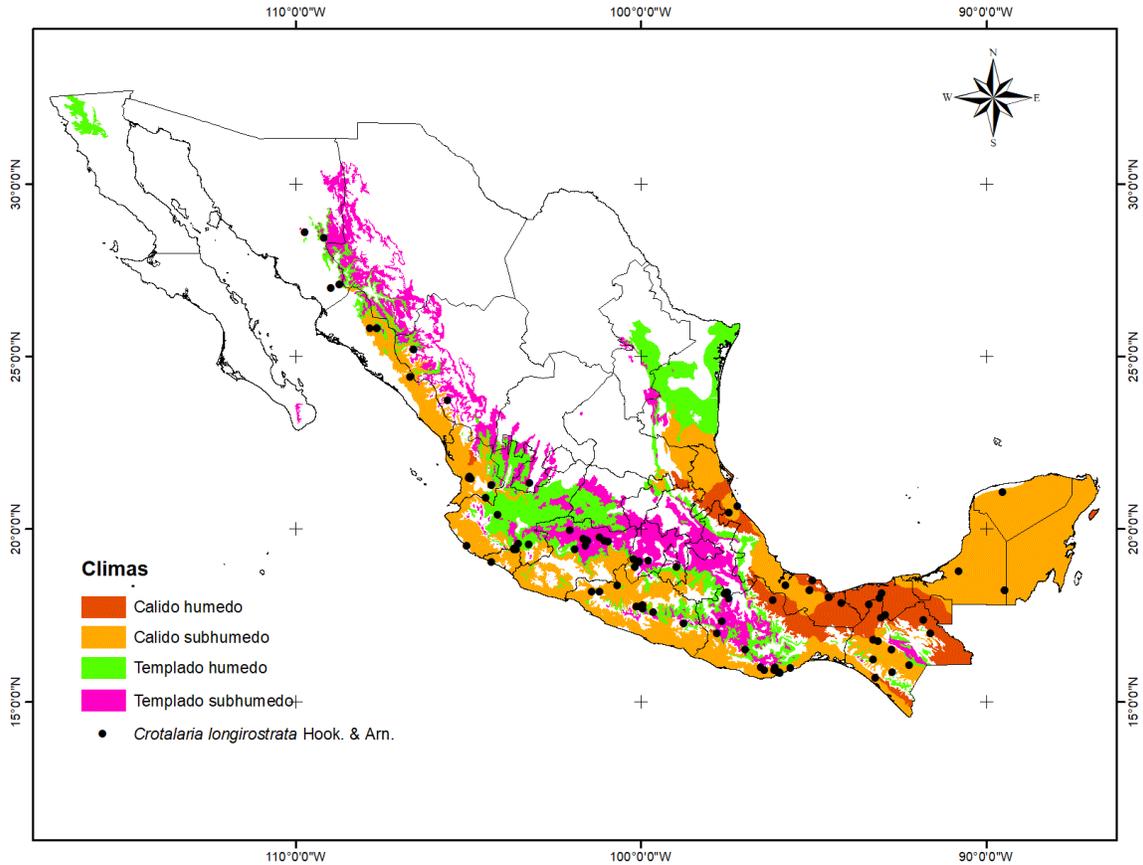
### Descripción botánica

La descripción botánica de *C. longirostrata*, de acuerdo con Soto-Estrada (2004) y Rzedowski *et al.* (2016) es la siguiente: planta herbácea perenne o arbusto de 1 a 3 m de altura, puede ser erecta o estar reclinada sobre otras plantas; sus tallos son ramificados, estrigulosos a casi glabros, presenta estípulas lineares a subuladas con longitud hasta de 1.5 mm, los peciolos son filiformes y con longitud de hasta 4 cm, sus hojas son trifolioladas, los folíolos son elípticos a obovados, su longitud alcanza entre 0.8 y 4 cm de longitud y de 0.5 a 2 cm de anchura, son truncados a agudos en el ápice, por lo general son cuneados en la base y con color verde oscuro y glabros en el haz, más pálidos y estrigulosos a casi glabros en el envés, la longitud de los peciolulos de los folíolos laterales alcanza hasta 1.5 mm; las inflorescencias en forma de racimos terminales presentan entre 10 y 30 flores amarillas y con manchas rojas, generalmente con pedúnculos largos, con raquis hasta de 20 cm de longitud, las brácteas son subuladas con longitud de 2 a 3 mm, los pedicelos presentan de 2 a 5 mm de longitud; el cáliz presenta simetría bilateral, longitud de 6 a 8 mm de

longitud, tres lóbulos abaxiales están unidos a mayor altura entre sí que con los dos restantes, y es estriguloso por fuera; el estandarte de 14 a 17 mm de longitud, es amarillo o con tintes café-morados; el fruto es una legumbre (fruto seco y dehiscente) casi cilíndrica, su color es café cuando madura y presenta dehiscencia explosiva, de 1.5 a 2.5 cm de longitud y diámetro de 5 a 9 mm, y es estriguloso; las semillas por fruto son 10 a 16, su forma es de riñón y su color es amarillo/pardo, su longitud es de 3 mm. El número cromosómico es  $2n = 32$ .

### **Distribución geográfica en México**

En México, las poblaciones de *C. longirostrata* se localizan desde el nivel del mar a los 2600 m de altitud. Sus poblaciones se han documentado en Chiapas, Tabasco, Veracruz, Oaxaca, Guerrero, Puebla, Morelos, Estado de México, Michoacán, Colima, Jalisco, Nayarit, Sinaloa y Chihuahua. Las poblaciones de chipilín se encuentran en campos y jardines, sobre las laderas de cerros, barrancas, cañadas húmedas, a los lados de corrientes de agua, en suelos profundos o rocosos, en planicies y bosque caducifolio mixto (Rzedowski *et al.*, 2016; Soto-Estrada, 2004) (Figura 1.1). Las plantas de chipilín crecen en ambientes silvestres y en cultivo de traspatio (Morton, 1994; Rodríguez-Campos *et al.*, 1998).



**Figura 1.** Distribución de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. en México (coordenadas tomadas del herbario MEXU). Cartografía de INEGI. Continuo Nacional del Conjunto de Datos Geográficos de la carta de climas Escala 1:1 000 000, serie I.

## Importancia del chipilín

### Alimentaria y nutrimental

Chipilín es parte del grupo de los quelites. Las estructuras de la planta que se utilizan para consumo humano son hojas, tallos, yemas y flores tiernas. Estas estructuras se utilizan en la preparación de sopas, tamales y bebidas refrescantes; también se cocinan y consumen como verduras con sal y limón (Díaz-Domínguez *et al.*, 2011; Lara *et al.*, 2011; Morton, 1994).

En el sureste mexicano, Guatemala y El Salvador, el Chipilín es considerado una delicia culinaria, por lo que es parte de la gastronomía regional. El consumo de Chipilín genera saciedad en las personas que lo consumen y obtienen calorías y proteína vegetal (Cadena-Iñiguez y De la Cruz-Morales, 2012). El consumo de Chipilín en las áreas urbanas es menor que en las rurales porque es verdura silvestre, que principalmente se comercializan en las regiones donde se recolecta (Bye y Linares, 2000).

En las áreas de consumo, en Chiapas, Joo (1987) documentó que de un grupo de entrevistados 92 % consume chipilín y el resto lo consideró desagradable. Roque *et al.* (2011) promovieron el consumo de la planta en el estado de Chiapas; para esto, ellos elaboraron tostadas de maíz con hojas de chipilín. Los autores determinaron que 91 % de las personas de la muestra de estudio aceptó el producto. Pola *et al.* (2016) reportaron que las galletas adicionadas con hojas verdes de Chipilín son más ricas en proteínas que las de tipo comercial. El pan con harina de trigo y hoja de Chipilín incrementó su valor alimenticio, por el mayor contenido de proteína y la presencia de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante, en comparación con los preparados sólo con harina de trigo (Ek-Chulim *et al.*, 2018). De acuerdo con lo anterior, el consumo de hojas de Chipilín por humanos es posible. La FAO (2018) y Arias *et al.* (2003) catalogaron a chipilín como una de las 16 especies de plantas comestibles por poblaciones étnicas, campesinas y ciudadinas de Mesoamérica. Las características nutrimentales, basadas en la composición, de hojas de Chipilín son similares o mayores a las de otras especies (Cuadro 2).

Arias *et al.* (2003) documentaron que en tallos con hojas, hojas con pecíolo y hojas la concentración de proteína cruda fue 30.6, 36.3 y 38.3 % en tejido seco y la concentración de fibra cruda fue 22.8, 13.1 y 11.8 %, respectivamente. Duke y Atchley (1986) documentaron que 100 g

de semillas de *C. longirostrata* contienen 33.9 y 3.4 g de proteína y grasa; sin embargo, la semilla es toxica para humanos.

**Cuadro 2.** Composición de Chipilín (*C. longirostrata*), espinaca (*Spinaca oleracea* L.), acelga (*Beta vulgaris* var cicla) y hierba mora (*Solanum* sp.), en 100 g de tejido fresco\*.

Componentes	Chipilín	Espinaca	Acelga	Hierba mora
Energía (Kcal)	56-63	23	19-27	45
Carbohidratos (g)	7.6-9.1	3.7	3.7-4.8	7.3
Proteína (g)	7.0	2.8	1.8-2.9	5.1
Fibra (g)	2-3	2-4	2	4.3
Ceniza (g)	1.5	1.7	1.2	1.8
Grasa (g)	0.5-1.0	0.4	0.3	0.8
Calcio (mg)	240-370	99	62-67	226
Hierro (mg)	4.9	2.7	1.8-3.9	12.6
Fosforo (mg)	72	49	5.3	74
Tiamina (mg)	0.33	0.1	0.05	0.2
Niacina (mg)	1-2	0.7	0.5	0.97
Riboflavina (mg)	0.2-0.5	0.19	0.23	0.35
Vitamina A (µg)	333-667	469	300-330	34
Vitamina C (mg)	50-100	28	6-30	92

\*INCAP (2012); Ledesma *et al.* (2010).

La proteína de chipilín es deficiente en metionina y fenilalanina, que son aminoácidos esenciales para los humanos (deben obtenerse de los alimentos, ya que no los sintetiza el organismo). Por esto, la combinación de chipilín con cereales, como el maíz y el arroz (Astiasarán Anchía *et al.*, 2007), que contienen proteína con esos aminoácidos, es recomendable. Los ejemplos de alimentos

de este tipo son el tamalito o el caldo de chipilín-que se mezcla el grano de elote (Pola *et al.*, 2016; Roque *et al.*, 2011).

### **Económica**

Diversos grupos étnicos incluyen Chipilín regular en su alimentación; por lo que, la especie tienen importancia económica en esos lugares. Chipilín se comercializa principalmente en los sitios donde se recolecta; los recolectores arreglan manojos de tallos con hojas tiernas y los venden a los distribuidores de mercados tianguis, o en las calles casa por casa, su venta persiste todo el año en el sureste de México (Lara *et al.*, 2011). Estas prácticas representan autoempleo y generan recursos, lo que posibilita un ingreso económico con poca o ninguna inversión monetaria (Lara *et al.*, 2011).

En el 2008, *C. longirostrata* se introdujo en los mercados minoristas y supermercados del noreste de EE.UU., con apoyo de un proyecto desarrollado en la Universidad de Massachusetts y asistencia del CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuario y Forestal) ubicado en El Salvador. Las hojas secas o frescas de Chipilín las vendieron en bolsas plásticas; el precio fue de 9 dólares por kilo. Además, vendieron frascos de chipilín en salmuera (Mangan *et al.*, 2010).

### **Herbolaria**

En México y otros países de Centro-América algunas especies del género *Crotalaria* se utilizan en herbolaria. La actividad biológica de Chipilín se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos, como flavonoides, saponinas, cumarinas, taninos, antraquinonas, antronas y alcaloides (Arias *et al.*, 2003; Cruz-Rodríguez *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2011). Además, su utilidad para combatir la anemia, reumatismo y vómito se ha reportado. La forma de uso es por infusión, para prepararla un manajo de hojas se hierve en agua y se toma como caldo; además, la

hoja cruda actúa como un purgante (Caballero, 2013; Cruells, 2004; Morton, 1994; Orantes-García *et al.*, 2018). También, las hojas y las flores actúan como sedante y evitan el insomnio (Morton, 1994). La raíz de la planta, aunque se considera venenosa, se usa para combatir el alcoholismo (Cruells, 2004).

## **Importancia para la agricultura**

### **Tolerancia a sequía y remediador de suelos**

Algunas especies del género *Crotalaria*, como *C. juncea* L. (Duke, 1983; Navas y Bernal 1999; Sampaio *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2002) y *C. ochroleuca* (Sarwatt y Mkiwa, 1988), exhiben tolerancia al déficit de humedad en la etapa inicial del cultivo cuando las raíces primarias y laterales se han extendido. En contraste, Sikuku *et al.* (2013) documentaron que *C. ochroleuca* fue sensible a la suspensión de riego durante 12 a 15 días; ya que, sólo tolera tres días sin riego, se recomienda el riego diario o cada tres días.

Agarwal *et al.* (2014), Cardoso *et al.* (2005) y Uraguchi *et al.* (2006) documentaron que *C. juncea* presenta tolerancia a metales pesados, como cadmio, cromo y níquel, y crecen bien en suelos contaminados; por lo que, actúa como fitorremediador.

Además, *C. juncea* y *C. longirostrata* incorporan hasta 250 kg ha<sup>-1</sup> de N al suelo al año (Guamán-Díaz, *et al.*, 2016; Jiménez *et al.*, 2005).

### **Control biológico**

Los extractos de tallo, ramas y raíces de *C. longirostrata* presentan actividad antifúngica contra *Fusarium* sp., *F. verticillioides* y *Aspergillus flavus* (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2017). También se ha utilizado para el control de nematodos de *Meloidogyne* sp. en suelos agrícolas (García *et al.*, 2011).

Las raíces y semillas de esta especie mezcladas con harina de maíz se utilizan en el campo como veneno para animales (Panda *et al.*, 2015). Además, en un estudio preliminar se demostró la capacidad fungistática de la especie, aunque no mostró capacidad fungicida, sí tuvo acción contra *Staphylococcus epidermidis* (26.6 %) y *Citrobacter freundii* (10.3 %) (Granados *et al.* 2018). Los extractos de semillas y hojas con diclorometano y metanol, en concentración de 400 ppm inhibieron 87 % del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (Peñaloza y Peláez, 2008). Este efecto se relacionó con la presencia del alcaloide de pirrolizidina (monocrotalina) que también está presente en la raíz (Flores *et al.*, 2009; Wink, 2003). Su uso potencial como insecticida aún es objeto de análisis y estudios.

### **Producción de biomasa**

*Crotalaria longirostrata* y *C. juncea* durante la temporada de lluvia producen biomasa fresca hasta 2.4 t ha<sup>-1</sup> y en época seca 0.6 t ha<sup>-1</sup> (Rubio *et al.*, 2008) a partir de la tercera semana después de la poda presentan brotes vegetativos. La producción de biomasa varía entre años y sitios de cultivo. Reeves *et al.* (1996) y Amabile *et al.* (2000) señalaron que *C. juncea* es una alternativa forrajera y reportaron producción de 5.9 t ha<sup>-1</sup> de biomasa fresca durante la temporada de verano/otoño y 6.9 t ha<sup>-1</sup> en primavera/verano, respectivamente.

### **Métodos agronómicos para la alteración del crecimiento de las plantas**

#### **Poda dirigida**

Algunos estudios realizados en plantas cultivadas bajo condiciones de invernadero, han cuantificado la respuesta por efecto de poda, despunte o defoliación que implica la eliminación selectiva de un órgano de la planta, como ramas, hojas, brotes o raíces modificando el hábito de

crecimiento natural, para aumentar la calidad de los cultivos y los árboles frutales (Jin *et al.*, 2018; Khan y Ahsan, 2000). Otra práctica que se realiza es el decapitado, que consiste en eliminar la yema terminal con el fin de disminuir el crecimiento del tallo, evitar la floración y fructificación, así como estimular el crecimiento y la calidad de las hojas (Guerra, 2000). Estas alteraciones se han utilizado en horticultura para asegurar y regular la producción en el rendimiento y calidad de los cultivos y los árboles frutales (Kumar *et al.*, 2017; Schupp *et al.*, 2017). Por ejemplo, la poda en plantas de arándano es una práctica utilizada para promover un equilibrio entre el crecimiento vegetativo y reproductivo, con el fin de optimizar el rendimiento y calidad de frutos (Retamales and Hancock, 2018).

### **Reguladores del crecimiento**

Son sustancias que juegan un papel clave en el desarrollo en las plantas, ya que son capaces de regular de manera predominante los procesos fisiológicos de las plantas, como el crecimiento y la diferenciación en respuesta a las señales del ambiente como la luz (Hernández y García, 2016). Estas son moléculas señalizadoras que se localizan en los tejidos de una planta y en cantidades específicas en cada tejido de acuerdo al proceso que regulan, como la división celular, el crecimiento, la diferenciación de los órganos (vegetativos, reproductivos y de las raíces), también, regulan la embriogénesis, la germinación de las semillas, la caída de las hojas y la senescencia, en respuesta algún tipo de estrés biótico y abiótico (Bishop *et al.*, 2015; Porta y Jiménez-Nopala, 2019). De acuerdo con Azcón-Bieto y Talón (2013), Bishop *et al.* (2015), Davies (2010), Taiz y Zeiger (2010), actualmente se han descrito 11 tipos de hormonas vegetales de las cuales cinco se relacionan con el crecimiento fisiológico de las plantas (giberelinas, ácido abscísico, citoquininas, auxinas y etileno (Cuadro 3). Compuestos investigados recientemente que tienen un papel regulador en el desarrollo de las plantas; como brasinoesteroides, poliaminas, ácido jasmónico,

ácido salicílico y estrigolactonas, cada una de estas hormonas tiene sus propias propiedades particulares (Bishop *et al.*, 2015). De acuerdo con Davies (2010), Neumann *et al.* (2020), el término reguladores del crecimiento corresponde a compuestos químicos sintéticos con influencias similares a las fitohormonas. Los efectos producidos por estos compuestos químicos se han dilucidado en gran parte a partir de aplicaciones exógenas. Mediante trabajos de investigación en plantas mutantes se han descubierto varios de estos reguladores del crecimiento con una actividad biológica que iguala o supera la de las hormonas endógenas.

La combinación de dos o más reguladores de crecimiento, aplicados simultáneamente en concentraciones bajas, alteran el crecimiento de las plantas; por ejemplo, la combinación de 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ANA generan hasta 22 brotes de espárrago (Fazelzadeh *et al.*, 2013).

**Cuadro 3.** Clasificación de los principales reguladores de crecimiento.

	Hormona vegetal	Derivados	Efecto en la planta	Efecto a nivel celular	Síntesis	
Promotores de crecimiento	Auxinas		Formación y elongación de tallos.	División y elongación celular. Diferenciación celular.	L-Triptófano	
		AIA	Formación de raíces adventicias.	Aumenta contenido osmótico y permeabilidad celular.		
		AIB	Latencia apical.	Disminución de la presión de pared celular.		
		2,4-D	Regula fototropismo, geotropismo.	Favorece hidrólisis de almidón.		
	Citocininas			Estimulan germinación de semillas.	Pueden iniciar la proliferación de tejidos vegetales madre.	Adenina
		Kinetina		Formación y elongación de raíces.	Estimula la división celular. Estimula la morfogénesis.	
		Zeatina Benciladenina		Activa la senescencia de hojas.	Están en las células de los ápices radiculares.	
		4-hidroxifeniletíl alcohol		Estimulan desarrollo fotomorfogénico. Estimula la generación de brotes axilares a nivel vegetal.		
				Induce la germinación.	Estimula elongación celular en respuesta a condiciones de luz y oscuridad.	ent -kaureno

Hormona vegetal	Derivados	Efecto en la planta	Efecto a nivel celular	Síntesis
Giberelinas	GA1	Aumenta el desarrollo de tejidos de manera constante.	Favorece el crecimiento embrionario.	
	GA2 GA3,...GA9	Alargamiento de segmentos nodales.  Elongación de raíces, hojas jóvenes, floración.  Promueven la formación de flores y frutos.	Actúa endógena durante los procesos de germinación y desarrollo apical.	
Inhibidores y control de reproducción	Etileno	Regula maduración y senescencia vegetal. Promueve la abscisión de hojas, floración y frutos.	Se produce en cualquier órgano vegetal.	Metionina
		Estimula la maduración de frutos.	Induce la reducción de ácidos nucleicos, la degradación de proteínas, disminución de la membrana celular.	
		Desarrollo de órganos sexuales.	Induce degradación de lípidos, peroxidación y ruptura de pigmentos en hojas.  Inhibe la acción del ácido jasmónico y ácido giberelico.	
		Regula y mantiene la latencia de las semillas.	Promociona la producción de tejidos zigotos.	

Hormona vegetal	Derivados	Efecto en la planta	Efecto a nivel celular	Síntesis
Ácido abscísico	-----	Estimula la maduración de semillas.	Inhibe el crecimiento celular.	Isopentil Pirofosfato
		Puede inhibir el proceso de germinación vegetal. Regula la traspiración celular (Estomas). Puede inducir la senescencia vegetal y floración vegetal. Inhibe crecimiento de tallos y no de raíces.	Tiene un fácil acceso a la membrana celular vegetal. Sintetizado en tejidos jóvenes como el endodermo de plantas madre y en algunos tejidos vegetales de las semillas (Testa).	
Ácido salicílico		Potencializa el crecimiento de la floración.	Rol inhibitorio en la síntesis de etileno a nivel celular.	Fenilalanina
		Incrementa la longevidad floral. Control y protección de procesos de estrés. Mejora la tolerancia de la germinación a bajas temperaturas.	Control de actividad fotosintética. Control de la conductividad de los estomas.	

## **Fisiología de la semilla**

La calidad de las semillas cultivadas la definen características físicas, fisiológicas, genéticas y fitosanitarias (ISTA, 2005). Para caracterizar especies que no se cultivan, además de las características anteriores para definir la calidad de las semillas, también se toman en cuenta aspectos ecológicos (Leishman *et al.*, 2000); entre estos están los de su propagación, dispersión, germinación, emergencia y respuesta al almacenamiento (Ayala-Cordero *et al.*, 2004). Esta información puede ayudar a implementar programas de conservación y manejo.

La cantidad de endospermo, tamaño del embrión, la distancia entre ellos y la morfología de la semilla están relacionados con el tamaño de la semilla y tienen implicaciones en la germinación y el vigor (Forbis *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2013). La morfología de las semillas y otros caracteres a menudo son útiles para identificar especies, y también pueden ayudar a establecer sus relaciones taxonómicas (Ninkaew *et al.*, 2017). En algunas especies de leguminosas la limitación para su uso agronómico y restauración ecológica es la latencia, debido, en la mayoría de los casos, a que su cubierta seminal es dura e impermeable (González *et al.*, 2011).

En el género *Crotalaria* las semillas son heterogéneas en sus características físicas (Crusciol y Soratto, 2009); es el caso de la maduración asincrónica y del color de la cubierta seminal (Beltramini y Pascualides, 2017; Pascualides y Planchuelo, 2007). Existe polimorfismo somático en especies como *C. juncea*, *C. retusa*, *C. incana* y *C. ochroleuca* (Beltramini y Pascualides, 2017; Carreras *et al.*, 2001; De Figueiredo y Silva, 2018), en parte, debido a que el contenido de humedad y la acumulación de biomasa seca en las semillas propician diversidad de tamaños (Gonzalez *et al.*, 2008).

La madurez fisiológica de las semillas de *C. juncea* se presentan cuando las cápsulas muestran entre 80 y 100 % de deshidratación; el almacenamiento de las semillas durante ocho meses reduce la latencia hasta 75 % (De Araju *et al.*, 2018). En algunas especies, como *C. juncea* y *C. incana*, la pigmentación de la semilla y el grosor de la testa son factores que modulan su imbibición, germinación y vigor. Las semillas de estas especies son impermeables, este carácter está relacionado con la latencia, longevidad y permanencia en el suelo (Carreras *et al.*, 2001; Pascualides y Ateca, 2013; Pascualides y Planchuelo, 2007; Da Silva *et al.*, 2016; Beltramini y Pascualides, 2017;).

González *et al.* (2008) documentaron que las semillas del género *Crotalaria* durante la germinación toleraron entre 25 y 40 °C y germinaron hasta 50 %. Las semillas de *C. ochroleuca* presentaron 87 % de germinación, entre 20 y 35 °C, y depende del color de la semilla (Da Silva *et al.*, 2016); las semillas de *C. retusa* color amarillo y marrón mostraron 20 y 70 % de germinación a temperatura promedio de 32 °C (De Figueiredo y Silva, 2018).

Semillas de *C. longirostrata* provenientes de Tabasco, México, presentaron 93 % de viabilidad, con la prueba con tetrazolio, y germinación de 60, 50 y 10 %, respectivamente, después de escarificarlas con ácido sulfúrico por 15 min, mantenerlas en agua a 80 °C por 1 min y sin algún tratamiento pregerminativo (Garduza-Acosta *et al.*, 2019). Estos resultados mostraron que la latencia de la semilla es física y con aumento del tiempo de escarificación, a 60 min, con ácido sulfúrico su germinación incrementó a 99 % (Ayala-Herrada *et al.*, 2010).

Hasta 85 % de las semillas de *C. juncea* germina en potenciales de agua de -1.2 MPa, generado con NaCl y CaCl<sub>2</sub> (Da Silva *et al.*, 2009). La planta puede crecer en suelos compactados con potencial de agua de -0.4 MPa (Ferrarotto y Otaiza, 2014).

Las semillas del género *Crotalaria* presentan algún tipo de latencia. La latencia puede deberse al recubrimiento duro, impermeable a agua y gases de la semilla, a la resistencia mecánica, a la posición del embrión, el requerimiento específico de luz y algunos inhibidores de la germinación (Boisson *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2004).

# **CAPÍTULO I. COMPONENTES DEL RENDIMIENTO DE *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. EN GUERRERO, MÉXICO**

## **1.1 RESUMEN**

Las plantas jóvenes de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. son alimento para humanos y animales, y se usan en herbolaria desde época prehispánica en México y Centroamérica, donde crecen silvestres, como arvenses o cultivadas incipientemente. La evidencia indica que para el cultivo comercial se necesita semilla de las poblaciones silvestres. El objetivo de este estudio fue evaluar los componentes del rendimiento de plantas silvestres de *C. longirostrata* y su relación con el sitio de recolecta. Plantas en etapa reproductiva se recolectaron en las localidades de Las Vigas, Cabecera municipal “Ometepec” y Llano Grande de los Hilarios Igualapa, Guerrero, México. Las variables evaluadas fueron número de: ramas, racimos, frutos y semillas por planta, frutos por racimo y por rama, semillas por racimo, por rama y por fruto, y el rendimiento de semilla por planta. El diámetro, la longitud y biomasa de los frutos y semillas de una localidad también se determinaron. Muestras del suelo de los sitios de recolecta se analizaron. Con excepción del número de semillas por fruto (8 a 10), los componentes del rendimiento y el rendimiento de semilla variaron significativamente ( $P \leq 0.05$ ) entre localidades. El número de ramas (11 a 19), racimos (31 a 101) y frutos (332 a 1284) por planta, de frutos por rama (31 a 62), y número de semillas por rama (287 a 553) y por planta (3054 a 10707), así como el rendimiento de semilla (32 a 110 g por planta) fue mayor en la localidad Las Vigas. Esta localidad presenta clima cálido subhúmedo, lluvias y canícula en verano, incluye manejo agrícola y ganadero y el suelo es franco arenoso, con capacidad de campo y punto de marchitez permanente menores, pero con capacidad de intercambio catiónico, y contenido de P y K intercambiable mayores respecto a los otros sitios. En general, las plantas de Llano Grande de los Hilarios Igualapa presentaron los componentes del rendimiento y

el rendimiento de semilla menor; esta localidad se diferenci6 por la ausencia de actividad antr6pica, su clima es semic6lido-h6medo, con lluvias en verano y suelo franco limoso, con m6s N, menos P extra6ble, contenido mayor de Ca intercambiable y conductividad el6ctrica mayor que en las otras localidades. En su ambiente silvestre, una planta puede producir miles de semillas independientemente de la localidad, en la que crezca.

**Palabras clave:** Chipil6n, frutos, racimos, ramas, semillas, tallo, valvas.

## 1.2 ABSTRACT

*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. are food for humans and animals and have been used in herbalism since pre-Hispanic times in Mexico and Central America, where they grow wild, as weeds or incipiently cultivated. Evidence indicates that seeds from wild populations is needed for commercial cultivation. The objective of this study was to evaluate the yield components and seed yield of wild plants of *C. longirostrata* and their relationship with the collection site. Plants in reproductive stage were collected in Las Vigas, Ometepe and Llano Grande de los Hilarios Igualapa, Guerrero, Mexico. The variables evaluated were number of: branches, clusters, fruits and seeds per plant, fruits per cluster and per branch, seeds per cluster, per branch and per fruit, and seed yield per plant. The diameter, length and biomass of the fruits and seeds of a locality were also determined. Soil samples from the collection sites were analyzed. With the exception of the number of seeds per fruit (8 to 10), the yield components and seed yield varied significantly ( $P \leq 0.05$ ) between locations. The number of branches (11 to 19), clusters (31 to 101) and fruits (332 to 1284) per plant, of fruits per branch (31 to 62), and number of seeds per branch (287 to 553) and per plant (3054 to 10707), as well as the seed yield (32 to 110 g per plant) were higher in Las Vigas locality. This locality has a warm sub-humid climate, rains and heat waves in summer, includes agricultural and livestock management and sandy loam soil, with lower field capacity and permanent wilting point, but with cation exchange capacity, and exchangeable P and K content higher than the other sites. In general, the plants of Llano Grande de los Hilarios Igualapa presented the lower components of yield and seed yield; this locality was differentiated by the absence of anthropic activity, its climate is semi-warm-humid, with rains in summer and loamy soil, with more N, less extractable P, higher content of exchangeable Ca and higher electrical conductivity

than in the other localities. In its wild environment, a plants produce thousands of seeds regardless of the location where it grows.

**Keywords:** “Chipilín”, clusters, branches, fruits, seeds, stem, valves.

### 1.3 INTRODUCCIÓN

El género *Crotalaria* incluye entre 600 y 700 especies, 79 de ellas son nativas de América; 21 de México, y nueve de ellas son endémicas (Sotto-Estada, 2004). Entre las especies con uso antrópico están *C. incana* L., *C. juncea* L., *C. longirostrata* Hook. & Arn. y *C. pumila* Ort. como fuente de materia orgánica y N en la agricultura (Jiménez *et al.*, 2005; Basurto-Peña, 2010; Linares & Bye, 2015; Camarillo-Castillo & Mangan, 2020). *Crotalaria juncea* se utiliza para elaborar cuerdas, cordeles, redes para pesca y papel (Tripathi *et al.*, 2012) y *C. retusa* L., *C. prostrata* Roxb. y *C. medicaginea* Lam. se utilizan en herbolaria por sus efectos antimicrobianos, antiparasitarios y antioxidantes (Devendra *et al.*, 2012).

*Crotalaria longirostrata* (Chipilín) se distribuye en Centroamérica y México. Particularmente, en México en los estados de Chiapas, Chihuahua, Colima, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Tabasco y Veracruz (Soto-Estada, 2004). El hábitat en el que crece la especie es bosque de pino-encino, en áreas abiertas, áreas con maleza y en zonas con cultivos diversos, como frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y maíz (*Zea mays* L.), en altitudes entre nivel del mar y 2 300 m (Tapia, 2000; McClung de Tapia *et al.*, 2014). En esas regiones, desde época prehispánica, los brotes tiernos, las hojas y los tallos jóvenes de Chipilín se utilizan en la preparación de alimentos y bebidas; asimismo, se utilizan en herbolaria y como forraje (Bye, 1981; Morton, 1994; Centurión *et al.*, 2003; Chávez *et al.*, 2009; Basurto-Peña, 2011; Laguna, 2016). Las hojas son fuente de carotenoides, vitamina C, hierro, calcio y proteínas; además, se ha documentado la presencia de compuestos fenólicos, como flavonoides, saponinas, cumarinas, taninos, antraquinonas, antranas y alcaloides (Arias *et al.*, 2003; Bibi *et al.*, 2015; Cruz-Rodríguez *et al.*, 2017). Otros estudios demuestran mayor diversidad de usos; un caso es el de los extractos de sus tallos, ramas y raíces que inhiben el desarrollo del micelio y la esporulación de

fitopatógenos y fitoparásitos como *Fusarium* sp., *Aspergillus flavus* Link (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2017; Cruz-Rodríguez *et al.*, 2020) y nematodos (Villar y Zavaleta-Mejía, 1990). Todas las estructuras de la planta se han evaluado en nuevas aplicaciones en herbolaria (Fischler y Wortmann, 1999; Arias *et al.*, 2003; Basurto-Peña, 2011), como abono verde (Desaeger y Rao, 2000), forraje (Arias *et al.*, 2003), alimento para el cultivo y multiplicación de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus* L.) (Guerra-Centeno *et al.*, 2016) y caracoles de agua dulce (*Pomacea flagellata* Say) que son alimento, rico en proteína para humanos (Martínez, 2016). Los usos tradicionales de chipilín, los actuales y los documentados como potenciales indican que su demanda tendrá soporte con su cultivo comercial. Lo que también asegura la disponibilidad de plantas para los consumidores regionales y externos y en diferentes épocas del año (Camarillo-Castillo y Mangan, 2020). Un obstáculo para el cultivo de las especies de *Crotalaria* es la falta de semilla comercial (Vinicius de Araujo *et al.*, 2018). Aunque las semillas para el cultivo pueden obtenerse de poblaciones silvestres, la producción comercial se asegurará con el cultivo de las plantas. Como en el caso de *C. brevidens* y *C. ochroleuca* (Mwakha *et al.*, 2020), para conocer el potencial agronómico y la viabilidad comercial de *C. longirostrata* es necesario conocer y mejorar el rendimiento de las estructuras de interés y promover la producción de semillas de calidad. Esto puede lograrse mediante la domesticación, el cultivo, la selección intensiva y el mejoramiento. Sin embargo, los programas de mejoramiento son exitosos cuando cuentan con variabilidad genética del germoplasma, ya que es la base para la selección (Peña-Valdivia *et al.*, 2012; Mwakha *et al.*, 2020). En el caso de *C. longirostrata* la información disponible sobre sus atributos genéticos y agronómicos es mínima.

La producción y el rendimiento de semilla son resultado del genotipo, el ambiente y la interacción genotipo (Mwakha *et al.*, 2020) y el ambiente, éste incluye factores como la radiación

solar, la temperatura, la disponibilidad de humedad y de nutrientes en el suelo (Rouached y Rhee, 2017). Al respecto, las plantas asimilan macronutrientes (N, K, P, Ca, Mg, S) y micronutrientes, como Fe, Mn, Cu y Zn del suelo a través de sus raíces, con lo que garantizan las funciones celulares (White y Brown, 2010). Las alteraciones en la disponibilidad de nutrientes minerales afectan el crecimiento; es el caso de la deficiencia de P, que disminuye el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis*; en contraste, la de Fe o S lo promueve, aunque los tres, junto con el N, son indispensables para la fotosíntesis y la respiración (Rouached y Rhee, 2017). La deficiencia combinada de P y N disminuye la productividad de las plantas silvestres en su ambiente natural y los cultivos (White y Brown, 2010). Esto es porque, el P estimula el desarrollo de los tejidos meristemáticos, el crecimiento de la planta, la conductibilidad hidráulica de las raíces, y sus efectos significativos en los rasgos agromorfológicos. Junto con el del N, en la altura de la planta, el número de hojas, el número de ramas, el número de frutos y el peso de 1000 semillas de *C. brevidens* y *C. ochroleuca* permitió demostrar que el nivel óptimo difiere entre las especies (Mwakha *et al.*, 2020). La producción de semilla se relaciona con el crecimiento de la planta completa; por lo que, para describir el rendimiento de las semillas se necesita evaluar el resto de la planta (Hall, 1980). Los componentes del rendimiento en las plantas involucran caracteres cuantitativos, como número y biomasa de sus órganos individuales, *e.g.*, número o biomasa de ramas, hojas, racimos, frutos y semillas, entre otros (Patrick y Colyvas, 2014). Por ejemplo, el desarrollo de las ramas laterales aumenta el sitio para el desarrollo de frutos; esto se ha demostrado mediante eliminación de la dominancia apical e inducción del desarrollo del número de ramas y el rendimiento de diversos cultivos (Tripathi *et al.*, 2013).

La comparación de los componentes del rendimiento permite el uso y rescate de la diversidad de especies silvestres con valor antrópico, como *C. longirostrata*, que se han incorporado y

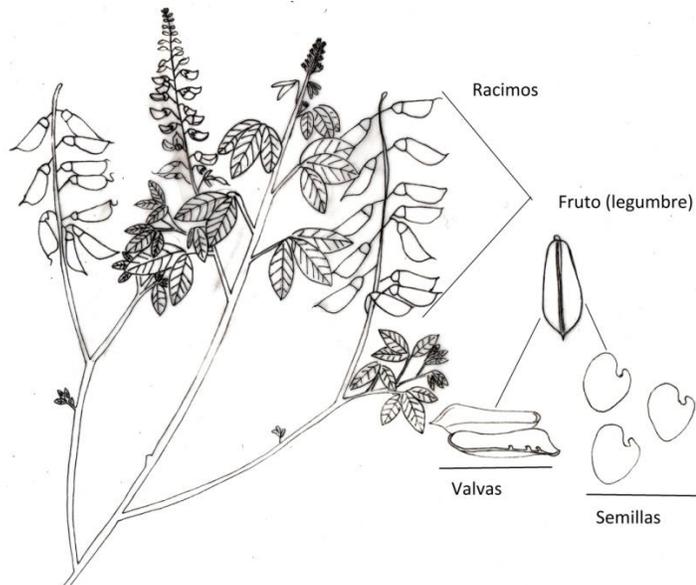
conservado en la agricultura tradicional y que están estrechamente relacionados con factores socio-culturales (Peña-Valdivia *et al.*, 2012; Solís Bonilla *et al.*, 2017; Castiñeiras *et al.*, 2000; Rojas-García *et al.*, 2021). La información de la fenología, morfología y rendimiento de las especies silvestres permite contrastar el desarrollo de las plantas *in situ* y *ex situ*, diseñar programas de conservación, propagación y cultivo de especies silvestres o semi-domesticadas (Peña-Valdivia *et al.*, 2012). Sin embargo, no se cuenta con esa información de las poblaciones silvestres de *C. longirostrata*. El rendimiento de semilla y de ciertas estructuras de la planta se ha documentado con fines agrícolas en especies como *C. juncea*, *C. brevidens* y *C. ochroleuca* (Jacobi *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2013; Meagher *et al.*, 2019; Rojas-García *et al.*, 2021). Tripathi *et al.* (2013) evaluaron el efecto del espaciamiento, de 30 x 10 cm a 45 x 20 cm, entre las plantas, y la eliminación de la dominancia apical (por corte del ápice) en los componentes del rendimiento de *C. juncea*; los autores observaron el incremento de ramas primarias y secundarias por planta (de 7 y de 13 a 17), del número de frutos por planta (en promedio de 47 a 74) y su biomasa (15.5 a 25 g), del número de semillas por fruto (7 a 9) y su rendimiento por planta (9.6 a 15 g) con la separación de las plantas. Los mismos autores observaron que, con excepción del número de semillas por fruto (7.5 a 8), esos componentes del rendimiento incrementaron mediante corte del ápice del tallo. La calidad agronómica de 13 recolectas de *C. brevidens* y 16 de *C. ochroleuca* se evaluó en Kenia mediante el cultivo en campo; la variabilidad en anchura de los frutos (1.85 a 1.04 cm y 2.20 a 1.25 cm) y el peso de 1000 semillas (5.44 a 7.70 g y 5.68 a 7.84 g) fue significativa dentro y entre especies. En contraste, las diferencias en la longitud de los frutos (en promedio 5.3 cm), el número de éstos por planta (14 en promedio) y el número de semillas (83 en promedio) no fueron significativas dentro o entre especies (Mwakha *et al.*, 2020).

El objetivo de este estudio fue determinar el rendimiento de semilla y otros componentes del rendimiento, como fueron número de: ramas, racimos, frutos y semillas por planta, frutos por racimo y por rama, semillas por racimo, por rama y por fruto, y el rendimiento de semilla, de plantas silvestres de *C. longirostrata* y su relación con el sitio de recolecta. La hipótesis es que, los componentes del rendimiento de plantas silvestres de *C. longirostrata* dependen del ambiente del sitio de recolecta.

## 1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.4.1 Localidades de recolecta e identificación del material vegetal

Plantas de *C. longirostrata* (Figura 1.1) con frutos maduros (color castaño-amarillento, que al agitarse emitían sonido similar de un sonajero cascabel) se cosecharon aleatoriamente, en enero de 2019, de rodales silvestres en las localidades de Las Vigas, Cabecera Municipal “Ometepec”, y Llano Grande de los Hilarios Igualapa, Guerrero, México (Cuadro 1.1). Los rodales tenían en promedio  $43 \pm 3.27$  plantas y ocupaban un área aproximada de  $100 \text{ m}^2$ ; las plantas tenían altura promedio de  $176 \pm 0.052$  cm y diámetro en la base del tallo de  $9.060 \pm 0.44$  mm. Las plantas fueron identificadas *in situ* por comerciantes-recolectores de *C. longirostrata* de cada localidad. La identidad taxonómica se confirmó en ejemplares recolectados *ex profeso*, herborizados y registrados en el Herbario-Hortorio CHAPA, del Colegio de Postgraduados (accesión Núm. 155775). Los ejemplares de *C. longirostrata* Hook. & Arn. consultados corresponden a las colectas Núm.: Es-604 de Campeche; 12, 26, 33, 40, 64, 81, 3661, 2768 y 5428 de Chiapas; 14, 3728, 4001 y 4464 de Jalisco; 69, 268 y 2294 de Michoacán; 121 y 530 de Oaxaca; 2036 de Sinaloa; y 1636 de Tabasco.



**Figura 1.1.** Estructuras de las plantas de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. recolectadas en Las Vigas, Cabecera municipal “Ometepec” y Llano Grande de los Hilarios Igualapa, en Guerrero, México.

## 1.4.2 Variables evaluadas

### 1.4.2.1 Plantas

Las plantas se trasladaron, separadas unas de otras, al laboratorio de Biofísica y Fisiología Ambiental, del Programa de Posgrado en Botánica del Colegio de Postgraduados. Con base en lo fundamentado por Huerta-Lovera *et al.* (2018), Mwakha *et al.* (2020) y Tripathi *et al.* (2013) en el laboratorio se evaluó el número de: ramas, racimos, frutos y semillas por planta, frutos por racimo y por rama, semillas por racimo, por rama y por fruto, y el rendimiento de semilla por planta. El diámetro, la longitud y biomasa de los frutos y semillas de una localidad también se determinaron para complementar la información de los componentes del rendimiento. El diámetro y la longitud de los frutos se determinó con un vernier digital (Truper, CALDI-6MP; 14388). La biomasa (g) de los frutos, las valvas y las semillas se determinó en una balanza analítica (Scientech® SA 120,

precisión de  $\pm 0.0001$  g). Los frutos se mantuvieron en bolsas de papel, dentro de cajas de cartón durante su evaluación.

#### **1.4.2.2 Suelo**

De acuerdo con la NOM.021-RECNAT-2002 (SEMARNAT, 2002), de cada sitio se obtuvieron tres muestras de 1 kg de suelo, de 0 a 20 cm y 20 a 40 cm de profundidad. El suelo se clasificó con los criterios de la WRB (IUSS Working Group WRB, 2015). El análisis de las muestras de suelo, de acuerdo con lo descrito por van Reeuwijk (2002), incluyó: color (carta de colores Munsell), densidad (probeta), retención de humedad (olla de presión), conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico, pH, bases intercambiables ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ) (acetato de amonio), y materia orgánica (Walkley-Black), nitrógeno total (micro-Kjeldahl), P soluble (Olsen y Dean, 1965).

**Cuadro 1.1.** Localidades y características de los sitios de muestreo de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. en Guerrero, México (CONAGUA, 2020; García, 2004).

Localidad	Las Vigas	Cabecera Municipal de Ometepec	Llano Grande de los Hilarios Igualapa
Descripción (denominación)	Con manejo agrícola y ganadero (MAG)	Con actividad urbana (AU)	Sin actividades antrópicas (SAA)
Ubicación	16° 45' 03" N, 99° 14' 05" O	16° 41' 01" N, 98° 24' 08" O	16° 45' 38" N, 98° 26' 18" O
Altitud	60 m s.n.m.	300 m s.n.m.	690 m s.n.m.
Clima	Aw <sub>2</sub> (w) Cálido subhúmedo, lluvias y canícula en verano	Aw <sub>2</sub> (w) Cálido subhúmedo, lluvias y canícula en verano	A(C)m(w) Semicálido-Húmedo, lluvias en verano
Precipitación anual	media 1100 mm	1100 mm	1000-1500 mm
Temperatura anual	media 25 - 28 °C	26 - 28 °C	18 - 26 °C
Vegetación aledaña	Árboles de <i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	Árboles de <i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp., <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam., y herbáceas <i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq.) Cass y <i>Euphorbia hirta</i> L.)	Árboles de <i>Ebenopsis ebano</i> , <i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp., <i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. entre otros

### **1.4.3 Diseño experimental y análisis estadístico**

Las variables se analizaron mediante un ANDEVA bajo diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos o localidades de muestreo, una planta como unidad experimental y tres repeticiones por localidad. Cuando se observaron diferencias entre tratamientos se realizó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Cuando no se cumplieron los supuestos normalidad, homogeneidad de varianzas e independencia se empleó la prueba de Kruskal-Wallis (H) seguida de la prueba comparaciones de pares con el programa estadístico InfoStat versión 2016 (Di Rienzo *et al.*, 2008). Los datos que no cumplieron los supuestos de la prueba de Kruskal-Wallis (H) (homogeneidad de varianzas e independencia) se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney ( $P \leq 0.05$ ). También se aplicó el análisis de correlación de Pearson y de componentes principales (CP) a los componentes del rendimiento con Rstudio 3.6.3. (RStudio Inc, Boston, EE.UU.; RStudio Team, 2020).

## 1.5 RESULTADOS

### 1.5.1 Componentes del rendimiento

#### 1.5.1.1 Número de ramas

El número promedio de ramas por planta varió ( $P \leq 0.05$ ) entre las localidades. En la localidad MAG (con manejo agrícola y ganadero aledaño) el número de ramas por planta representó hasta 45 % más que en las otras localidades (Cuadro 1.2).

#### 1.5.1.2 Número de racimos

El número promedio de racimos por planta varió ( $P \leq 0.05$ ) entre las localidades. Las plantas de la localidad MAG presentaron en promedio el triple respecto a las otras localidades (Cuadro 1.2). La distribución de los racimos en las ramas fue heterogénea entre las localidades. En las localidades MAG y AU (con actividad urbana aledaña), en promedio la proporción mayor de racimos se concentró en las primeras ramas basales; en contraste en las plantas de la localidad SAA (sin actividad antrópica aledaña) la distribución pareció relativamente homogénea. Además, el número promedio de racimos varió entre las ramas a lo largo del tallo; en las localidades MAG y AU hubo ramas con promedio mínimo (0.3) de racimos y máximo de nueve independientemente de la ubicación de la rama (Figura 1.2 A, B y C).

#### 1.5.1.3 Número de frutos

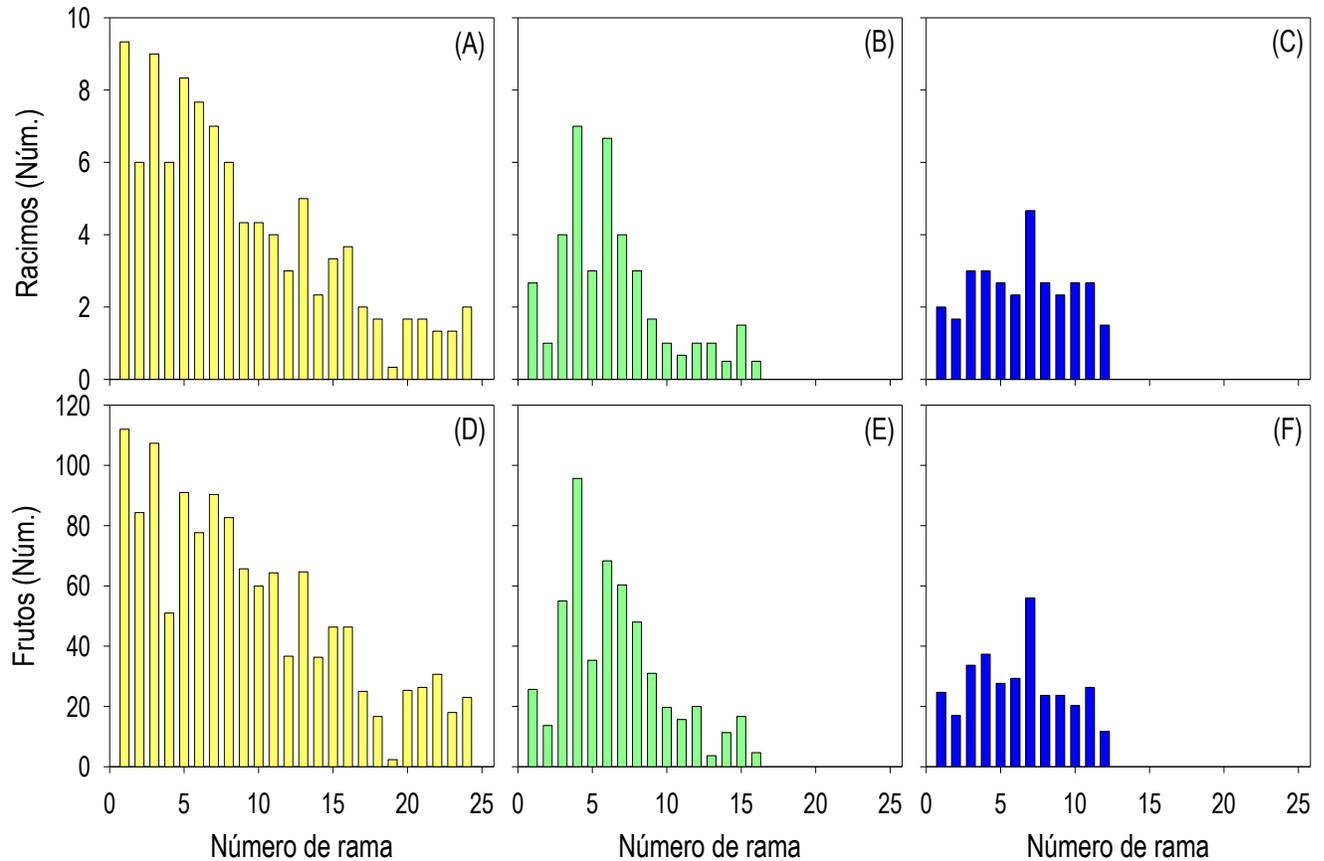
El número promedio de frutos por planta, por racimo y por rama varió significativamente ( $P \leq 0.05$ ) entre las localidades. Las plantas de la localidad MAG presentaron en promedio entre el doble y el triple de frutos respecto a las de las otras localidades. En contraste, los racimos de las plantas de la localidad AU tuvieron, en promedio, 12 % más frutos que en las localidades MAG y

SA. Aunque el número de frutos por racimo fue mayor en las plantas de la localidad AU, el número promedio de frutos por rama fue 40 % mayor en la localidad MAG respecto a las otras localidades (Cuadro 1.2).

**Cuadro 1.2.** Componentes del rendimiento (promedio  $\pm$  E.E.) de plantas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en tres localidades de Guerrero, México.

Localidad*	Ramas	Racimos	Frutos	Frutos	
	Núm./planta			Núm./racimo	Núm./rama
MAG	19.3 $\pm$ 2.4 a	101.3 $\pm$ 6.4 a	1284 $\pm$ 158 a	12.7 $\pm$ 0.3 b	62.1 $\pm$ 3.3 a
AU	12.0 $\pm$ 2.1 ab	37.7 $\pm$ 9.3 b	525 $\pm$ 142 b	13.9 $\pm$ 0.7 a	43.7 $\pm$ 6.3 b
SAA	10.7 $\pm$ 0.8 b	31.0 $\pm$ 1.7 b	332 $\pm$ 52.1 b	11.8 $\pm$ 0.5 b	31.1 $\pm$ 4.0 b
<b>Semillas</b>					
	Núm./racimo	Núm./rama	Núm./fruto	Núm./planta	g/planta
MAG	105.7 $\pm$ 2.9 b	553.8 $\pm$ 52.9 a	8.34 $\pm$ 0.04 a	10707 $\pm$ 666 a	109.96 $\pm$ 0.7 a
AU	133.2 $\pm$ 7.2 a	418.1 $\pm$ 60.0 ab	9.57 $\pm$ 0.04 a	5017 $\pm$ 634 b	51.67 $\pm$ 0.6 b
SAA	99.6 $\pm$ 5.1 b	286.3 $\pm$ 37.3 b	9.21 $\pm$ 0.05 a	3054 $\pm$ 415 c	31.45 $\pm$ 0.6 c

\*MAG: con manejo agrícola y ganadero circundante, AU: con actividad urbana circundante y SAA: sin actividad antrópica circundante. Valores en la misma columna seguidos con la misma letra no muestran diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 1.2.** Promedio del número y distribución de racimos frutales y de frutos en las ramas, en sentido acrópeto, sobre el tallo de plantas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en Guerrero, México. Localidades MAG: con manejo agrím. y ganadero circundante (A y D), AU: con actividad urbana circundante (B y E) y SAA: sin actividad antrópica circundante (C y F).

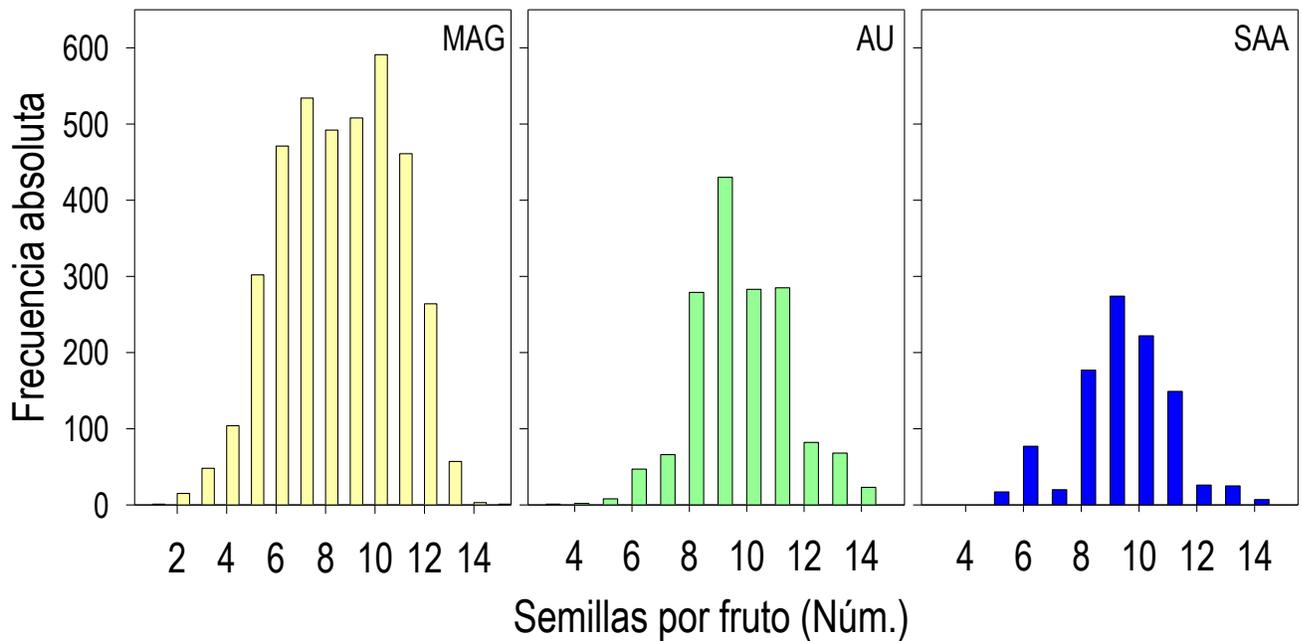
La distribución de los frutos en las ramas a lo largo del tallo fue heterogénea en las plantas de las tres localidades y mostró tendencias similares a la distribución de los racimos (Figura 1.2). En general, el número promedio de frutos en las ramas basales (en el primer tercio del tallo) de las plantas de las localidades MAG y AU, fue mayor al 50 % del total. Algunas de esas ramas presentaron alrededor de 100 frutos; en contraste, algunas ramas del centro del tallo y las del tercio superior, hacia el ápice, tuvieron sólo dos o tres frutos. En localidad SAA la distribución de los frutos en las ramas pareció relativamente homogénea (Figura 1.2 D, E y F).

#### 1.5.1.4 Rendimiento de semillas

El número promedio de semillas por racimo, por rama y por planta varió significativamente ( $P \leq 0.05$ ) entre las localidades. En el caso de los racimos, los de las plantas en la localidad AU promediaron 23 % más semillas que en las localidades MAG y SAA. En el caso de las ramas, las plantas de la localidad MAG presentaron en promedio entre 25 y 48 % más semillas que en las localidades AU y SAA, respectivamente. El número promedio de semillas por planta mostró las diferencias mayores entre las localidades; en la localidad MAG se cuantificó un promedio de 10707 semillas por planta, valor que representó 53 % más semillas que en las plantas de la localidad AU y 72 % más que en la localidad SAA (Cuadro 1.2).

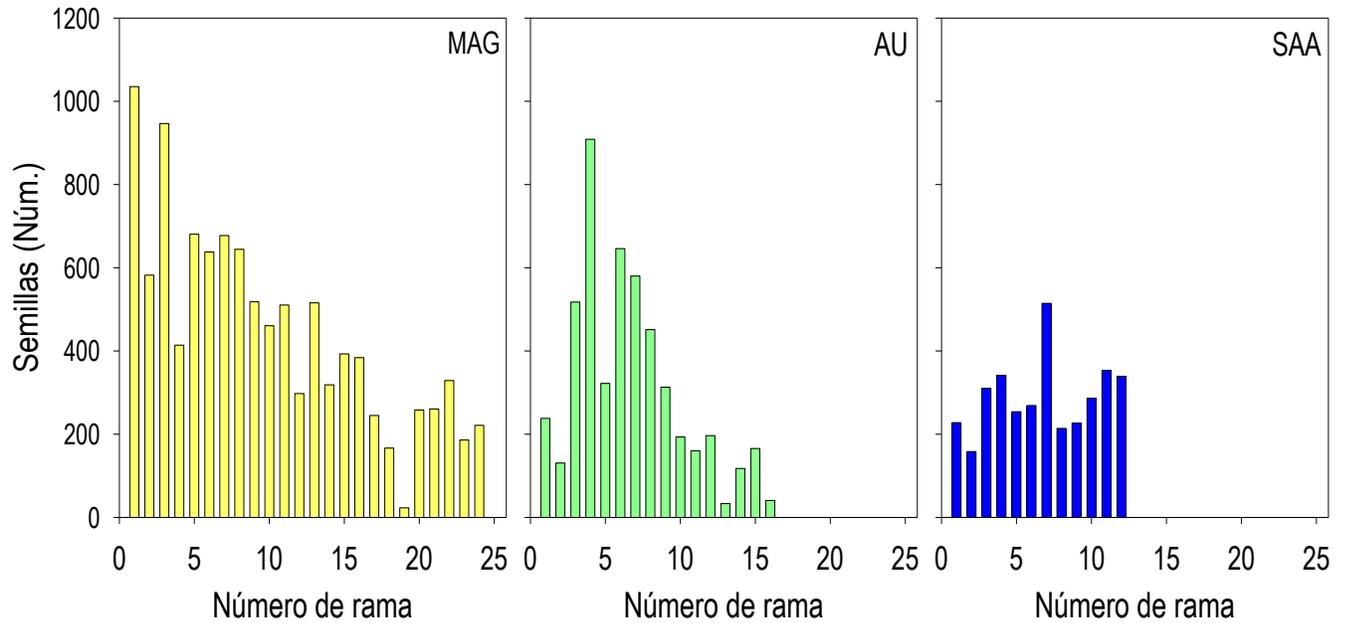
El número promedio de semillas por fruto (8 a 10) fue el carácter más estable en las plantas de las tres localidades, pues las diferencias en este carácter no fueron significativas ( $P > 0.05$ ; Tabla 1.2). Sin embargo, la frecuencia del número de semillas por fruto (Figura 3) mostró que en la localidad MAG los frutos tuvieron desde una hasta 15 semillas, a diferencia de los frutos en las plantas de las localidades AU y SAA que contenían mínimos de 3 y 5 semillas, respectivamente y máximos de 14 en ambos casos. La distribución de la frecuencia del número de semillas por fruto fue cercanamente simétrica en las localidades AU y SAA, con el máximo de nueve semillas por fruto en ambas. La distribución en la localidad MAG contrastó con las anteriores, ya que mostró dos máximos, en 7 y 10 (Figura 1.3).

Las diferencias en los componentes del rendimiento entre las localidades, ya descritas, resultaron en el rendimiento significativamente diferente entre ellas. La localidad MAG mostró el rendimiento significativamente mayor; este representó 53 y 71 % rendimiento mayor de semilla respecto a las localidades AU y SAA (Cuadro 1.2).



**Figura 1.3.** Frecuencia del número de semillas por fruto en plantas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en Guerrero, México. Localidades MAG: con manejo agrícola y ganadero circundante, AU: con actividad urbana circundante y SAA: sin actividad antrópica circundante.

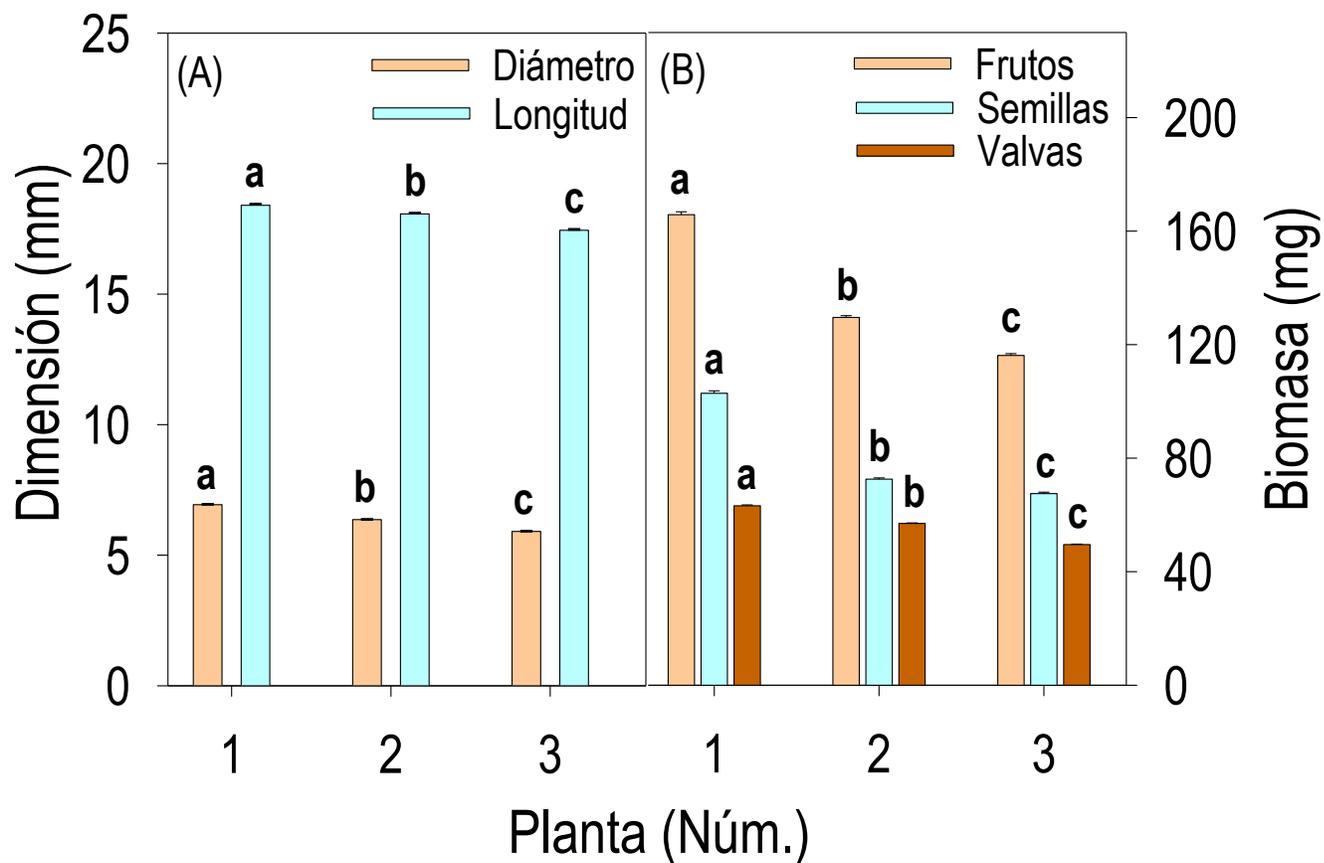
La distribución de las semillas en las ramas a lo largo del tallo fue heterogénea en las plantas de las tres localidades (Figura 1.4). Estas distribuciones mostraron tendencias similares a las descritas por los racimos y los frutos en las ramas en las tres localidades (Figura 1.2). Las diferencias principales son los valores de cada estructura (máximos cercanos a 10 en el caso de los racimos, 115 en el de los frutos y 1030 en el de semillas por rama). Así, el número promedio de semillas en las ramas basales (alrededor del primer tercio del tallo) de las plantas de las localidades MAG y AU fue mayor al 50 % del total. Varias de esas ramas presentaron más de 600 semillas y hasta cerca de 1000; al contrario, principalmente las ramas cercanas al ápice tuvieron los números menores de semillas. La distribución de las semillas en las ramas de las plantas de la localidad SAA difirió de las otras dos localidades en la relativa uniformidad; es decir, las ramas apicales acumularon cantidades de semilla cercanamente similares al resto (Figura 1.4).



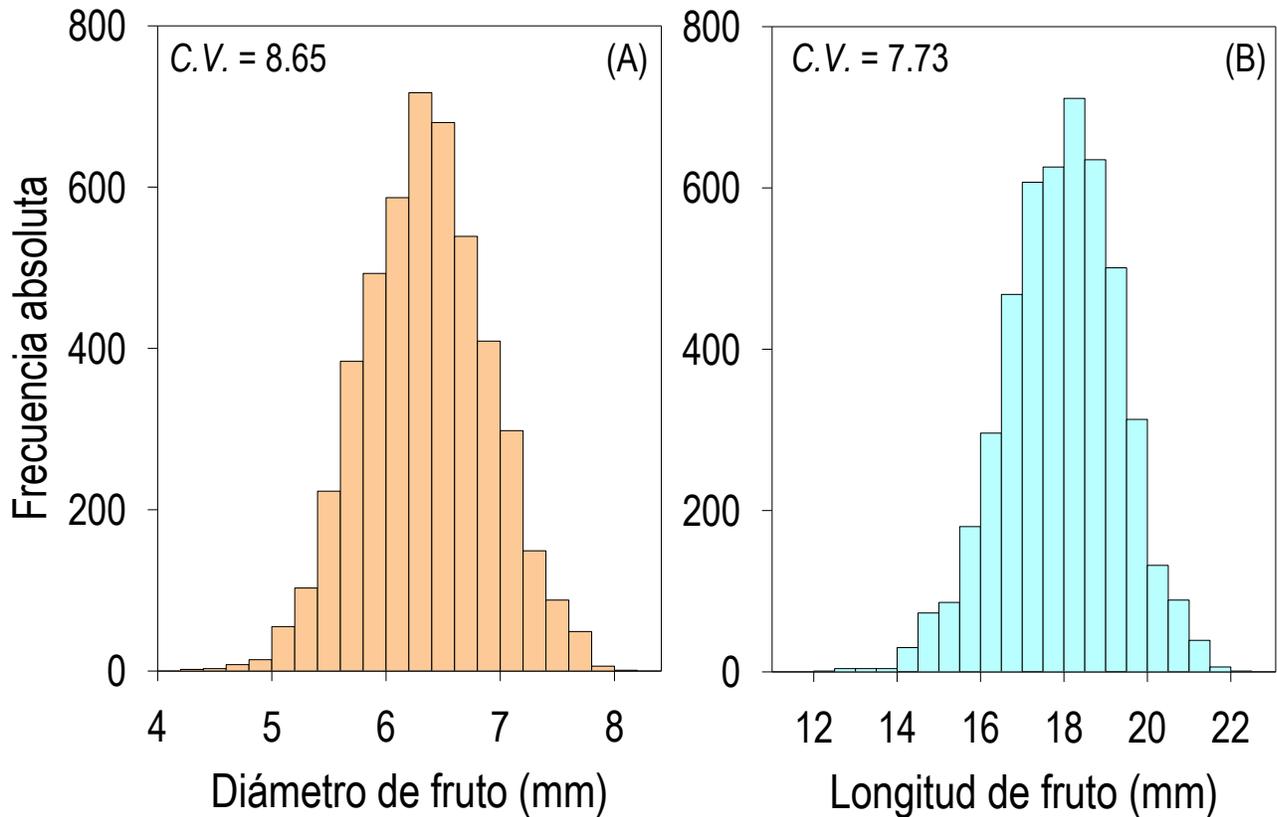
**Figura 1.4.** Promedio del número y distribución de semillas en las ramas, en dirección acrópeta, sobre el tallo de plantas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en localidades de Guerrero, México. Localidades MAG: con manejo agrícola y ganadero circundante, AU: con actividad urbana circundante y SAA: sin actividad antrópica circundante.

### 1.5.1.5 Longitud, diámetro y biomasa de los frutos

Las dimensiones y la biomasa de los frutos, valvas y semillas las cuantificamos en los 3852 frutos de las plantas muestreadas en la localidad MAG. Los frutos mostraron color castaño oscuro, se caracterizaron por ser frutos inflados y tres veces más largos que anchos (Figura 1.5A). El diámetro promedio (de 5.91 a 6.94 mm) y la longitud promedio (de 17.44 a 18.40 mm) difirieron ( $P \leq 0.05$ ) entre las plantas; sin embargo, independientemente de su origen silvestre las diferencias entre las dimensiones de esas estructuras son mínimas (Figura 1.5A). La distribución de la frecuencia del diámetro y de la longitud de los frutos de la muestra completa (de 3852 frutos) fue simétrica alrededor de la media; mostró la variación del diámetro entre 4 y 8 mm, con la frecuencia absoluta máxima de entre 6.2 y 6.4 mm (Figura 1.6A). En el caso de la longitud, la distribución fue de 12.5 a 22 mm, con frecuencia absoluta máxima entre 18 y 18.25 mm (Figura 1.6B).

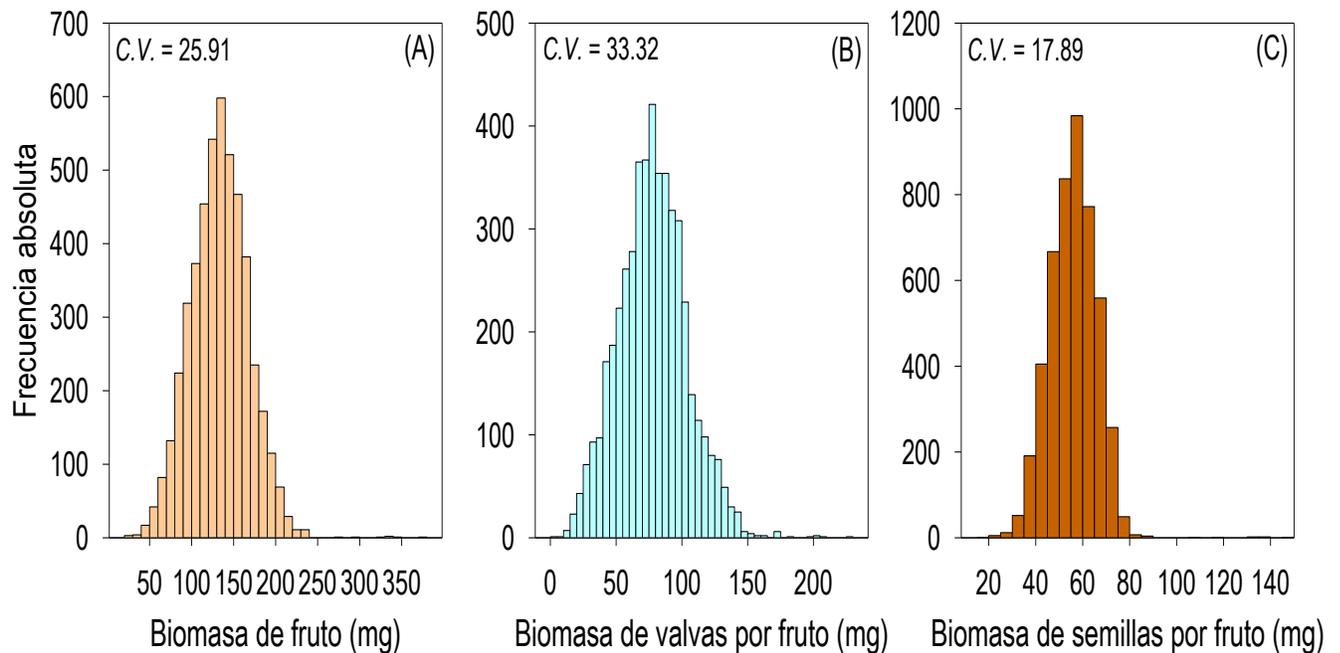


**Figura 1.5.** Promedio (+ *E.E.*) de las dimensiones de los frutos (A), de su biomasa y la biomasa de sus semillas y valvas (B) por planta de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn., de la localidad Las Vigas (con manejo agrícola aledaño), Guerrero, México.



**Figura 1.6.** Frecuencia del diámetro (A) y de la longitud (B) de los frutos de plantas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en Las Vigas, Guerrero, México (localidad con manejo agrícola aledaño).

Las diferencias ( $P \leq 0.05$ ) de la biomasa promedio de las valvas, los frutos, y las semillas representaron hasta 21.6, 29.9 y 34.4 %, respectivamente entre las plantas (Figura 1.5B). La distribución de la frecuencia de la biomasa de los frutos y de sus estructuras fue sesgada a la derecha (Figura 1.7 A-C); aunque, el sesgo en el lado derecho fue producto de una muestra de menos de 10 frutos con peso atípico alto en la muestra de cerca de los 4000 evaluados. Así, la frecuencia absoluta máxima de la biomasa de los frutos, las semillas y las valvas se identificó en intervalos estrechos: 55-60 mg, 130-140 mg y 170-175 mg, respectivamente (Figura 1.7 A-B).



**Figura 1.7.** Distribución de la frecuencia de la biomasa de los frutos (A), de sus valvas (B) y semillas (C) en las ramas a lo largo del tallo, en dirección acrópeta, de plantas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en Las Vigas, Guerrero, México (localidad con manejo agrícola aledaño).

Las dimensiones y la biomasa de los frutos y de sus estructuras se correlacionaron positivamente y en forma altamente significativa unas con otras (Cuadro 1.3); lo que mostró la alta asociación entre el crecimiento de los frutos y el rendimiento de semilla.

#### 1.5.1.6 Análisis de componentes principales

El análisis de CP incluyó las variables con correlación no significativa; ya que, si las variables están correlacionadas significativamente entre ellas, la información que aportarán será redundante y la condición de no colinealidad se violará para la regresión por mínimos cuadrados. En el análisis de CP, los dos primeros CP acumularon el 84.8 % de la varianza total reconocida. El CP1 se definió principalmente por el número de racimos por rama, frutos por rama y semillas por rama. El CP2 reveló la dependencia directa del número de semillas por racimo con el número de frutos por

racimo (Cuadro 1.4). La representación gráfica del CP2 en función de CP1 mostró que cada una de las variables evaluadas tiene efectos equivalentes en eso CP. La localidad AU traslapó completamente a la localidad SAA y gran parte de MAG; aunque, los componentes del rendimiento definieron a cada localidad (Figura 1.8).

**Cuadro 1.3.** Coeficientes de correlación de Pearson entre las dimensiones y la biomasa de los frutos de plantas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en Las Vigas, Guerrero, México (localidad con manejo agrícola alledaño).

Variable	Diámetro	Longitud	Biomasa de fruto	Biomasa de semillas	Biomasa de valvas
Diámetro	1.000	0.606***	0.772***	0.697***	0.797***
Longitud		1.000	0.643***	0.571***	0.698***
Biomasa de fruto			1.000	0.962***	0.875***
Biomasa de semillas				1.000	0.765***
Biomasa de valvas					1.000

\*\*\*  $P < 0.0001$

### 1.5.2 Características del suelo

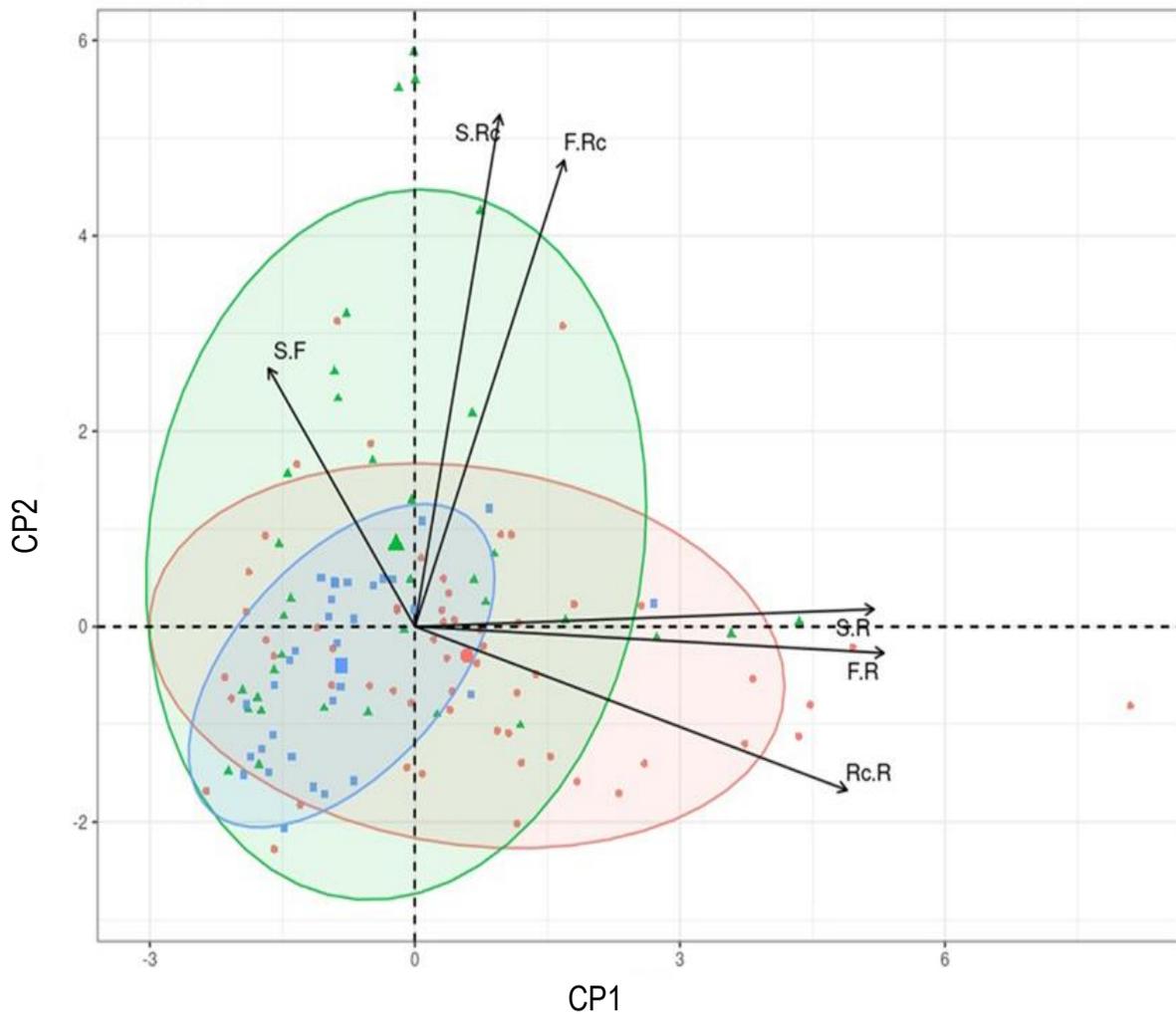
Entre las diferencias en el suelo de las tres localidades destacaron las siguientes. Los suelos se clasificaron de acuerdo con su textura como franco arenoso en las localidades MAG y AU y como franco limoso en la localidad SAA. La proporción de arcilla no difirió ( $P > 0.05$ ) entre las localidades, la proporción de arenas fue 24 % mayor ( $P \leq 0.05$ ) en MAG y AU, respecto a SAA; en contraste, en esta última los limos fueron 34.29 % más abundantes que en las otras dos.

**Cuadro 1.4.** Valores propios y proporción de la varianza para los primeros componentes principales generados a partir de los componentes del rendimiento de plantas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en tres localidades de Guerrero, México.

	Componente principal	
	1	2
Racimos por rama (Núm.)	<b>0.529</b>	0.215
Frutos por rama (Núm.)	<b>0.574</b>	0.034
Frutos por racimo (Núm.)	0.181	<b>-0.616</b>
Semilla por rama (Núm.)	<b>0.562</b>	-0.024
Semilla por racimo (Núm.)	0.103	<b>-0.676</b>
Semilla por fruto (Núm.)	-0.180	-0.340
Varianza acumulada	0.498	0.848

Los valores con trazo grueso en los componentes principales tuvieron aporte mayor.

Las localidades MAG y SAA fueron en promedio 21 % más ricas ( $P \leq 0.05$ ) en materia orgánica respecto a AU; además, los suelos difirieron en las concentraciones de los macroelementos N, P y K. La localidad AU presentó 55 % más N total y, junto con SAA, 9 % menos K soluble. Aunque, el K intercambiable no difirió entre las localidades. La concentración de P extraíble mostró el gradiente:  $MAG > AU > SAA$ , en el que la última localidad mostró hasta cinco veces menos P que MAG. La densidad aparente y la densidad real, relacionada con la compactación del suelo, fueron mayores en el suelo de la localidad AU.



**Figura 1.8.** Ordenación de los componentes principales (PC) 1 y 2 de plantas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en tres localidades de Guerrero, México, según los componentes del rendimiento (Rc. R: racimos por rama, F. R: frutos por rama; F. Rc: frutos por racimo; S. R: semillas por rama; S. Rc: semillas por racimo; S. F: semillas por fruto).

Además, la capacidad de campo y el punto de marchitez permanente del suelo mostraron el siguiente gradiente entre las localidades: SAA > AU > MAG, en el que los valores de estas dos características en la localidad SAA fueron 31.06 y 27.29 % mayores que en MAG. Aunque el pH y el Mg intercambiable no fue diferente entre las localidades, el Ca intercambiable mostró el siguiente gradiente AU > MAG > SAA, en el que los valores en AU fueron 38 % mayores que en SAA (Cuadro 1.5).

## 1.6 DISCUSIÓN

Las plantas recolectadas fueron arbustiformes, tuvieron tallo central erecto, leñoso sólo en su parte inferior (tallo sufruticoso), con altura mayor a 150 cm, frutos aun indehiscentes y valvas color castaño oscuro, similares a las descritas por Azurdía (2016) y Soto-Estada (2004). Entre las localidades se observaron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) en 90 % de las 10 variables del rendimiento evaluadas. Esta variabilidad se explica en parte por el carácter silvestre de las plantas (Peña-Valdivia *et al.*, 2012). Además, el comportamiento fisiológico diferenciado, que conduce a contrastes en los componentes del rendimiento de las variantes o biotipos (plantas de cada localidad) depende de las diferencias en los ambientes de crecimiento, lo que se conoce como interacción genotipo-ambiente (Mederos-Ramírez y Ortiz-Pérez 2021).

Entre los factores ambientales con mayor efecto en el crecimiento de las plantas, y por tanto en los componentes del rendimiento y rendimiento de semilla, están la precipitación y la temperatura ambiente. De acuerdo con los datos de CONAGUA (2022), las localidades MAG y AU muestran precipitación promedio anual total (1310 y 1350 mm, respectivamente) y distribución de la precipitación durante el año similares; además, a pesar de ciertas fluctuaciones de la temperatura media (26.5 y 27 °C) y máxima (32.8 y 33.1 °C) durante el año sus promedios son similares (Figura 1.9 A-B). Además, estas dos localidades comparten el mismo tipo de clima (Cuadro 1.1). En contraste, con estas similitudes de su ambiente, las plantas de ambas localidades difirieron significativamente en 60 % los componentes del rendimiento evaluados y en el rendimiento de semilla (Cuadro 1.2).

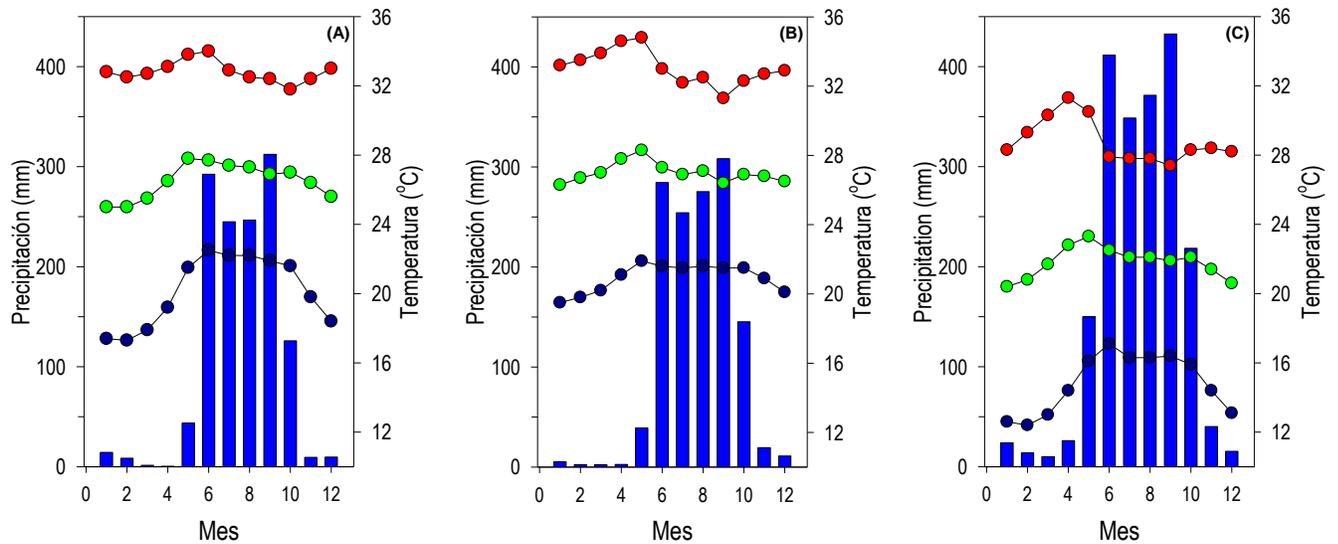
**Cuadro 1.5.** Características físicas y químicas del suelo de tres localidades de Guerrero, México.

	<b>Localidad*</b>		
	<b>MAG</b>	<b>AU</b>	<b>SAA</b>
Textura	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco limoso
<b>COLOR (seco)</b>			
Matiz (hue)	10YR	10YR	10YR
Brillo (value)	4	<b>6</b>	4
Pureza	3	<b>7</b>	5
<b>COMPOSICIÓN</b>			
Arcilla (%)	7 a	8 a	9 a
Arenas (%)	59 a	56 a	44 b
Limos (%)	34 b	36 b	47 a
Materia orgánica (%)	2.017 a	1.748 b	2.420 a
N total (%)	0.023 b	0.018 b	0.046 a
P extraíble (mg kg <sup>-1</sup> )	0.020 a	0.012 b	0.004 c
K soluble (cmol <sup>(+)</sup> kg <sup>-1</sup> )	0.271 a	0.165 b	0.163 b
<b>DENSIDAD, ESTADO HÍDRICO Y CONDUCTIVIDAD</b>			
Aparente (g/cm <sup>3</sup> )	1.52 b	1.91 a	1.49 b
Real (g/cm <sup>3</sup> )	2.68 b	2.85 a	2.78 ab
Capacidad de campo (%)	18.84 c	21.33 b	27.33 a
Punto de marchitez permanente (%)	9.43 c	10.39 b	12.97 a
Conductividad eléctrica (dSm <sup>-1</sup> )	0.02 b	0.02 b	0.07 a
Capacidad de intercambio catiónico (cmol <sup>(+)</sup> kg <sup>-1</sup> )	2.90 a	2.85 a	2.20 b
pH (1:2 suelo:agua)	5.46 a	5.23 a	5.10 a
<b>BASES INTERCAMBIABLES</b>			
Ca (cmol <sup>(+)</sup> kg <sup>-1</sup> )	1.59 b	1.92 a	1.19 c
Mg (cmol <sup>(+)</sup> kg <sup>-1</sup> )	0.72 a	0.53 a	0.56 a
K intercambiable (cmol <sup>(+)</sup> kg <sup>-1</sup> )	0.325 a	0.266 a	0.284 a

\*MAG: con manejo agrícola y ganadero circundante, AU: con actividad urbana circundante y SAA: sin actividad antrópica circundante. Letras iguales en una línea denotan que no hay diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ).

Además de lo anterior, el clima de la localidad SAA es diferente al de las otras dos, muestra mayor precipitación (total 2063 mm) y su ambiente es menos cálido (Figura 1.9 C); pero, 60 % de los componentes evaluados fueron similares en los de la localidad AU (Cuadro 1.2). Lo anterior puede ser evidencia de la presencia de tres biotipos, parcialmente distintos, con interacción específica a su ambiente. Respuestas equivalentes se han documentado en biotipos de frijol silvestre (Peña-Valdivia *et al.*, 2012).

La similitud de las dimensiones de los tallos entre las localidades es relevante por su relación con el rendimiento de los frutos y las semillas. Al respecto, los tallos desempeñan un papel de apoyo en el desarrollo de los órganos reproductores, como conductos para el transporte de recursos y como estructuras físicas que soportan el peso de los frutos en desarrollo. En leguminosas, como chícharo (*Pisum sativum*) y soya (*Glycine max* (L.) Merr.), el tamaño del tallo (altura y diámetro) es relevante, ya que puede recibir hasta un tercio de los fotoasimilados producidos por las hojas durante el desarrollo de los frutos y competir por ellos (Alerding *et al.*, 2017). Así, el crecimiento, axial y radial, y su conclusión antes o durante la etapa reproductiva tiene distintos efectos en el rendimiento de frutos y semillas (Purcell *et al.*, 2014). Si los tallos continúan la expansión radial durante la reproducción, los recursos se asignarán a la construcción de la pared celular secundaria, que incluye las síntesis de lignina, y al llenado de semillas. En especies de tallo erecto, que producen anillos concéntricos de tejidos secundarios, el crecimiento axial del tallo termina cuando la planta inicia la etapa de llenado de semillas (Purcell *et al.*, 2014). Actualmente, los aspectos relacionados con la terminación del crecimiento radial dentro del sistema de tallo y ramas en *C. longirostrata* se desconoce; por lo que, en estudios futuros podría evaluarse la anatomía y fisiología del desarrollo de esas estructuras para complementar el conocimiento de su aporte al rendimiento de frutos y semillas.



**Figura 1.9.** Climogramas basados en precipitación promedio (barras) y temperatura promedio mínima (círculos negros), media (círculos verdes) y máxima (círculos rojos) en Las Vigas (A), Ometepec (B) y Llano Grande de los Hilarios Igualapa (C), Guerrero, México. Cada barra y círculo representa los datos promedio mensuales (1: enero... 12: diciembre) durante un período de seis décadas, de 1950 a 2010 (CONAGUA, 2022).

El número significativamente mayor de 38 y 45 % de ramas en las plantas de la localidad MAG respecto a AU y SAA no fue proporcional a las diferencias en el número de racimos o frutos por planta entre las localidades; ya que, en la localidad MAG la cantidad mayor de racimos representó 63 y 70 % respecto a AU y SAA y las diferencias en la cantidad de frutos alcanzó 60 y 74 %, respectivamente. Estos resultados indican que la exposición de ramas, como uno de los componentes del rendimiento, repercute en el desarrollo de estructuras reproductivas en *C. longirostrata*. Al respecto, el espaciamiento entre las plantas es uno de los factores que afectan la ramificación y el rendimiento de las semillas en especies como *C. juncea* y soya (Tripathi *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2021), por su efecto en la tasa de crecimiento y en la competencia entre las plantas por los insumos necesarios para el crecimiento y el desarrollo. Xu *et al.* (2021) analizaron la contribución de las ramas al rendimiento de soya mediante dos fechas de siembra en seis densidades de siembra de dos cultivares; el número de vainas por planta creció con el aumento del

número de ramas, mientras que el número de vainas por unidad de área disminuyó, por lo que, el rendimiento también se redujo. Además, los autores observaron respuesta diferente de los cultivares; uno, con una densidad menor de plantación, incrementó el rendimiento como resultado de más ramas; otro cv. incrementó su potencial de rendimiento con una mayor densidad de plantación debido al menor número de ramas y su tolerancia mayor a la competencia por densidad de siembra mayor. Así, el rendimiento de semillas puede aumentarse en plantas con poca capacidad de ramificación en siembra con densidad moderada (Xu *et al.*, 2021). La relevancia de las ramas en el incremento del rendimiento de semilla en *C. juncea* se debió a que el desarrollo de las ramas laterales aumentó los sitios para el desarrollo de frutos; esto se comprobó cuando se eliminó la dominancia apical, al separar el ápice del tallo (Tripathi *et al.*, 2013). Por lo que, en estudios futuros la densidad de plantas de *C. longirostrata* en los sitios muestreados complementará el análisis de las diferencias en el rendimiento de semilla.

Los frutos del presente estudio tuvieron longitud y diámetro que coincidieron con los de ejemplares de herbario (longitud entre 1.5 y 2.5 cm y diámetro entre 5 y 9 mm) recolectados en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla-Oaxaca, México (Soto-Estada, 2004) y en la región del Bajío, México (Rzedowski *et al.*, 2016). Estos resultados indican que las dimensiones de los frutos de *C. longirostrata* son caracteres relativamente estables y típicos en diversas regiones de México. Esta homogeneidad contrasta con la distribución de los racimos y frutos a lo largo del tallo en las localidades muestreadas. En relación con los frutos, las valvas son componentes del rendimiento que pueden tener efecto en el rendimiento de semilla. Esas estructuras, además de la función protectora a las semillas, pueden tener actividad fotosintética y aportar asimilados y nutrientes que impulsan el crecimiento de las semillas; además, la señalización generada por las valvas coordina

el crecimiento, llenado y maduración de las semillas, todo esto con repercusiones en el rendimiento (Bennett *et al.*, 2011).

El número de semillas por fruto fue el componente del rendimiento que no difirió entre las localidades. Pero las diferencias en la cantidad de racimos y frutos por rama y por planta entre las localidades pueden repercutir en el rendimiento de semilla; aunque, con tendencias parcialmente diferentes. Esto permite suponer la presencia de tres biotipos, uno por cada localidad muestreada, que de acuerdo con el ACP no difieren completamente, ya que comparten ciertas características en los componentes del rendimiento. En contraste con la homogeneidad de las dimensiones de los frutos, el número de semillas, nueve en promedio, por fruto en las tres localidades fue poco menor al documentado, de entre 10 y 16, en algunos ejemplares de herbario (Soto-Estada, 2004; Rzedowski *et al.*, 2016).

La cantidad de frutos por planta, como componente del rendimiento, está relacionada directamente con la producción de semillas (Guerrero, 1999). Estas últimas tienen importancia central en el presente estudio, ya que es el insumo crítico en los sistemas agrícolas. Es decir, para el cultivo y multiplicación de plantas, en campo de cultivo o invernadero, es necesario contar con semilla suficiente y de buena calidad (Vinicius de Araujo *et al.*, 2018). En este estudio se demostró que las poblaciones silvestres de *C. longirostrata*, del estado de Guerrero, producen en promedio de 3054 a 10707 semillas por planta. En contraste, el número promedio de semillas por fruto es un carácter homogéneo (8 a 10 semillas por fruto) entre las localidades. Además, la calidad fisiológica de las semillas de las tres regiones muestreadas está actualmente en proceso, para complementar la información.

Los resultados del presente estudio indican que las plantas más productivas, con mayor número de ramas, racimos y frutos por planta, número de frutos por racimo y por rama, número de semillas por rama y por planta y rendimiento de semilla se desarrollaron en la localidad MAG, con suelo franco arenoso, con capacidad de campo y punto de marchitez permanente menores, pero con capacidad de intercambio catiónico, y contenido de P y K intercambiable mayores respecto a los otros sitios. Además, el sitio MAG es una zona con potreros y cultivos, como maíz y frijol, cercanos. En contraste, las plantas con los valores significativamente menores de esos componentes del rendimiento y del rendimiento correspondieron a la localidad SAA, en suelo franco limoso, con pendiente de 25°, entre cerros y con capacidad de campo, punto de marchitez permanente, conductividad eléctrica y N total mayores respecto al de los otros sitios; además, esas plantas con los rendimientos menores crecieron en suelo con menor contenido de Ca intercambiable y P extraíble, respecto a los otros sitios. Al contrario, el pH y el contenido de Mg y de K intercambiable fueron similares en las tres localidades, por lo que no se relacionaron directamente con las diferencias en el rendimiento y sus componentes entre las localidades.

## 1.7 CONCLUSIONES

Los componentes del rendimiento y el rendimiento de semilla de poblaciones de *C. longirostrata* muestran variabilidad genética (biotipos) y especificidad al ambiente de crecimiento. Los biotipos, independientemente del ambiente en el que crecen, producen miles de semillas por planta con potencial de uso para multiplicar las plantas *ex situ*. Sin embargo, los ambientes menos cálidos y los suelos con capacidad de campo y punto de marchitez permanente mayores parecen menos favorables para la producción de semillas. Al contrario, el suelo con mayor capacidad de intercambio catiónico, concentración de materia orgánica, P extraíble y K soluble parece favorecer el desarrollo de las plantas de *C. longirostrata*, que resulta en alto rendimiento de semilla.

Actualmente, la información del rendimiento y sus componentes del germoplasma de *C. longirostrata* es escasa; por lo tanto, los resultados del presente estudio son la información más completa con la que se cuenta a la fecha y puede ser la base para la producción agrícola de la especie. Aunque, es necesaria la evaluación de la calidad fisiológica de la semilla y su respuesta a las variaciones ambientales anuales.

## **CAPITULO II. CALIDAD FÍSICA Y FISIOLÓGICA DE LA SEMILLA DE *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. (CHIPILÍN) RECOLECTADAS EN GUERRERO, MÉXICO**

### **2.1 RESUMEN**

El interés por el consumo y producción agrícola de Chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.) es creciente; sin embargo, para el cultivo es necesaria semilla de buena calidad comercial, pero la fuente principal de germoplasma son las poblaciones silvestres. El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad física y fisiológica de semillas de Chipilín recolectadas en tres sitios de Ometepec, Guerrero, México. Los sitios de recolecta incluyeron uno con actividad urbana (AU), uno con manejo agrícola y ganadero circundante (MAG) y uno sin actividad antrópica (SAA). Las evaluaciones fueron anchura, grosor, longitud, biomasa, contenido de humedad y germinación de las semillas; además, la viabilidad y vigor de los embriones y la emergencia de las plántulas. La germinación de las semillas intactas se evaluó con 25, 30, 35, 40 y 45 °C, el efecto del envejecimiento acelerado por 24, 48, 72 y 96 h y la escarificación mecánica. Los resultados se analizaron con ANDEVA y comparación de medias con la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Las características físicas de las semillas difirieron significativamente ( $P \leq 0.05$ ) en sus dimensiones físicas y biomasa. Las semillas de la localidad AU y MAG presentaron viabilidad de embriones (85 a 91 %) significativamente mayor respecto a las de AU (51 %), sin relación con la calidad física. La viabilidad de los embriones repercutió parcialmente en la germinación total, germinación promedio diaria y emergencia de las plántulas. Las semillas de Chipilín de las localidades muestreadas presentaron cerca de 90 % de latencia, de la que se elimina desde 30 hasta 80 % con el incremento de la temperatura de germinación, tratamiento pregerminativo con temperatura de 45 °C y H.R. saturada, aplicado aquí como envejecimiento acelerado, y escarificación mecánica.

Esto demuestra que las semillas de esas poblaciones silvestres son recurso potencial para la producción de plantas de chipilín.

**Palabras clave: germinación, imbibición, tetrazolio, viabilidad, vigor**

## 2.2 ABSTRACT

The interest in the consumption and agricultural production of Chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.) is growing; however, good commercial quality seed is necessary for cultivation, but the main source of germplasm is wild populations. The objective was to evaluate the physical and physiological quality of Chipilín seeds collected from three sites in Guerrero, Mexico. The sites included one with urban activity (AU), one with surrounding agricultural and livestock management (MAG) and one without human activity (SAA). The evaluations were width, thickness, length, biomass, moisture content and seed germination; in addition, the embryos viability and vigor and seedlings emergence were quantified. The germination of intact seeds was evaluated at 25, 30, 35, 40 and 45 °C, the effect of accelerated aging at 24, 48, 72 and 96 h and seed mechanical scarification. Results were analyzed with ANOVA and comparison of means with Tukey's test ( $\alpha = 0.05$ ). The physical characteristics of the seeds differed significantly ( $P \leq 0.05$ ) in their physical dimensions and biomass between collects. The seeds from the AU and MAG localities showed significantly higher embryo viability (85 to 91 %) compared to those from AU (51 %), unrelated to physical quality. The viability of the embryos partially affected total germination, average daily germination and seedling emergence. The Chipilín seeds from the sampled localities presented about 90 % dormancy, of which 30 to 80 % is eliminated with the increase in germination temperature, pregerminative treatment, at 45 °C and saturated H.R., applied here as aging, and mechanical scarification. This shows that the seeds of these wild populations are a potential resource for the production of chipilín plants.

**Keywords:** germination, imbibition, tetrazolium, viability, vigor

## 2.3 INTRODUCCIÓN

*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. también se conoce como Chipilín, es integrante de la familia Leguminosae (Fabaceae), en México se distribuye en regiones tropicales y subtropicales principalmente de Oaxaca, Guerrero, Chiapas, Tabasco y Veracruz (Soto-Estrada, 2004; Rzedowski *et al.*, 2016). Esta es una de las 16 especies registradas como comestibles por las poblaciones étnicas, campesinas y ciudadinas de Mesoamérica (FAO, 2018; Arias *et al.*, 2003). El aprovechamiento de *C. longirostrata* incluye sus hojas jóvenes y flores en la alimentación y herbolaria, desde tiempos prehispánicos, principalmente de poblaciones silvestres, y en proporción menor de cultivos de traspatio (Castro-Lara *et al.*, 2014; Basurto-Peña, 2011; FAO, 2018). El follaje joven es fuente de carotenoides, vitamina C, hierro, calcio, proteínas (Arias *et al.*, 2003; Ek-Chulim *et al.*, 2018), aminoácidos esenciales como arginina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, treonina y valina (Mateos-Maces *et al.*, 2020), y de metabolitos secundarios, como (Bibi *et al.*, 2015; Cruz-Rodríguez *et al.*, 2020).

El interés de las comunidades indígenas en México y de la comunidad latina creciente en la región noreste de los Estados Unidos por las plantas de Chipilín ha promovido investigaciones sobre su producción agrícola, con el objetivo de mantener disponible la planta durante el año (Mangan *et al.*, 2010; Camarillo-Castillo y Mangan, 2020). Sin embargo, se ha documentado que uno de los obstáculos para el cultivo de las especies *Crotalaria* es la falta de semilla con calidad comercial aceptable (Araujo *et al.*, 2018).

La calidad de semilla es resultado de la interacción de atributos (genéticos, fisiológicos, sanitarios y físicos) que las hacen adecuadas para la siembra (Baskin y Baskin, 1998). Estos atributos son fundamentales para el éxito o el fracaso de la producción de un cultivo; por lo que,

un lote de semilla con calidad física, sanitaria y fisiológica mayor germina y produce sincrónicamente plántulas homogéneas en ambientes diversos (Peña-Valdivia *et al.*, 2012). Para caracterizar especies que no se cultivan, también se toman en cuenta características evaluables mediante el desarrollo y estandarización de protocolos, sencillos y confiables para cada fin particular (Baskin y Baskin, 2014). En el caso de la calidad física se incluye color, brillantez, tamaño, biomasa, uniformidad y ausencia de fracturas y daños visibles (Peña-Valdivia *et al.*, 2013; ISTA, 2018). Además, parte de la calidad fisiológica (viabilidad, germinación, velocidad de germinación y características de las plántulas) puede ser de interés determinarla en condiciones favorables y desfavorables (prueba de fío, prueba de envejecimiento acelerado, entre otras) según el grado de domesticación de la semilla y de acuerdo a la especie (Copeland y McDonal, 2001; ISTA, 2018). Para que la germinación se realice en condiciones favorables debe controlarse la disponibilidad de agua y O<sub>2</sub> (eliminación de CO<sub>2</sub>), la temperatura ambiente y la luz (Copeland y McDonald, 2001; Baskin y Baskin, 2004). En el caso de las semillas es relevante el tamaño, el espesor y estructura de la testa y el potencial matricial (Bewley *et al.*, 2013) y las reservas, como los carbohidratos, proteínas y lípidos (Bewley *et al.*, 2013; Peña-Valdivia *et al.*, 2013). Además, si la semilla está en el suelo, debe considerarse la profundidad y tipo de suelo. Al respecto, Celis-Velázquez *et al.* (2008 a) documentó la relevancia del vigor de las semillas para evaluar el germoplasma mejorado de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.); así como, la eficiencia del uso de reservas de las semillas de frijol silvestre y cultivares tradicionales (criollos) y mejorados, sembrados entre 2.5 y 10 cm de profundidad, durante la emergencia y desarrollo inicial de la plántula (Celis-Velázquez *et al.*, 2008 b; Peña-Valdivia *et al.*, 2013).

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad física y fisiológica de semillas de *C. longirostrata* recolectadas en tres sitios de Ometepec, Guerrero, México.

## 2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.4.1 Material vegetal

Frutos maduros (color café-oscuro que al agitarse emitían sonido similar a un sonajero cascabel) de *C. longirostrata* se cosecharon aleatoriamente de 10 plantas, en enero de 2019, de poblaciones silvestres en las localidades Las Vigas, Cabecera Municipal “Ometepec” y Llano Grande de los Hilarios Igualapa, Guerrero, México. La identidad taxonómica se confirmó en ejemplares recolectados ex profeso, herborizados y registrados en el Herbario-Hortorio CHAPA del Colegio de Postgraduados (accesión Núm. 155775). Las evaluaciones en las semillas incluyeron contenido de humedad, longitud, anchura, biomasa y porcentaje de germinación en condiciones estándar en laboratorio, junto con la viabilidad y vigor de los embriones y la emergencia de las plántulas en suelo agrícola en condiciones de invernadero. Además, en las semillas incluimos la prueba de envejecimiento acelerado. Las evaluaciones se hicieron en el laboratorio de Biofísica y Fisiología Ambiental y el invernadero del Programa de Posgrado en Botánica del Colegio de Postgraduados.

### 2.4.2 Evaluaciones

#### 2.4.2.1 Determinación de humedad

De acuerdo con el método descrito por la ISTA (2018), un gramo de semillas contenidas en cajas de aluminio con tapa se deshidrató a  $103 \pm ^\circ\text{C}$  por 17 h, se realizaron cuatro repeticiones. El contenido de humedad se obtuvo mediante la siguiente igualdad.

$$\text{Porcentaje de Humedad} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

Dónde:

$m_1$  = peso de la caja y su tapa (g),  $m_2$  = peso de la caja, tapa y semillas (g),  $m_3$  = peso de la caja, tapa y semilla después del secado (g).

#### **2.4.2.2 Determinación de las dimensiones y la biomasa de las semillas**

La longitud, anchura y grosor de doscientas semillas de cada localidad, se midieron individualmente con un vernier digital (Truper, CALDI-6MP;14388; precisión  $\pm 0.01$ ). La biomasa se cuantificó individualmente en 200 semillas de cada localidad, en una balanza analítica (Scentiech, SA120, precisión 0.0001 g). Para conocer el peso de mil semillas (P1000S), ocho grupos de 100 semillas, por cada localidad, se pesaron en balanza analítica (Scentiech, SA120, precisión 0.0001 g) y cada valor se multiplicó por diez (ISTA 2018).

#### **2.4.2.3 Evaluación de la viabilidad y el vigor de los embriones**

Esta prueba se hizo con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio de acuerdo con la norma internacional para el análisis de semillas (ISTA, 2018). Para ablandar la testa seminal, las semillas escarificadas en el lado opuesto al eje hipocótilo con una lija del número 80, se hidrataron con agua destilada durante 16 h. Después se retiró la cubierta seminal, con ayuda de agujas de disección y la visualización con un microscopio estereoscópico. Las semillas sin cubierta seminal se colocaron en una solución de 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio al 1 % (en agua p:v), durante 24 h en oscuridad. Después se calificó la intensidad de la coloración. La clasificación de los embriones, según su coloración (International Seed Testing Association, 2010; Maldonado-Peralta *et al.*, 2016) fue: vivos y con vigor alto o vivos con vigor bajo. En el primer caso, los embriones mostraron tinción total y color rojo intenso; la segunda clase correspondió a los embriones no viables, que permanecieron parcialmente teñidos, con coloración tenue o incoloros. Los valores se

expresaron en porcentaje. En esta evaluación se incluyeron cuatro repeticiones de 50 semillas por localidad.

#### **2.4.2.4 Evaluación de la germinación de las semillas**

La prueba estándar descrita por la ISTA (ISTA, 2018) se utilizó para cuantificar la germinación de las semillas en cajas Petri, con hojas de papel filtro, permanentemente humedecidas con agua destilada, a 25, 30, 35, 40 y 45°C, y en oscuridad. La evaluación incluyó a las semillas intactas (sin escarificar) y escarificadas. Previamente, las semillas fueron desinfectadas con solución de hipoclorito de sodio comercial al 5 % (en agua v:v), por un minuto, las cuales se enjuagaron repetidamente con agua destilada y se depositaron en las cajas Petri previamente esterilizadas.

Una semilla se consideró germinada cuando la raíz emergida tenía alrededor de 5 mm de longitud (ISTA, 2018). Las semillas germinadas se contabilizaron cada 24 h, durante 35 días. Los parámetros de la germinación analizados y las ecuaciones para su cálculo son los siguientes:

- a) Porcentaje de Germinación total (PGT).

$$PGT (\%) = \frac{\text{Número de semillas germinadas}}{\text{Número de semillas en la unidad experimental}} \times 100$$

- b) Germinación media diaria (GMD).

$$GMD = \frac{PGT}{X}$$

X= Número de días para alcanzar el valor PG.

En todos los tratamientos la unidad experimental consistió de 25 semillas por caja Petri y se evaluaron cuatro repeticiones.

#### **2.4.2.5 Prueba de envejecimiento acelerado de las semillas**

El envejecimiento acelerado de las semillas se evaluó con el método propuesto por Delouche y Baskin (1973), con modificaciones realizadas por Rincón y Molina (1990). Las semillas se mantuvieron sobre una malla de alambre inoxidable, dentro de cajas Petri (10 x 10 x 5 cm), a  $41\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y HR de 100 % (100 mL de agua destilada) durante 96 h, sin contacto con el agua. La germinación de esas semillas se evaluó a las 24, 48, 72 y 96 h con la prueba estándar (ISTA, 2018). La unidad experimental para el envejecimiento incluyó 100 semillas y la unidad experimental para evaluar la germinación en cada uno de los cuatro tiempos de muestreo consistió de 25 semillas; en todos los casos se incluyeron cuatro repeticiones. El recuento de la germinación se hizo cada 24 h durante 35 días.

#### **2.4.2.6 Evaluación de la emergencia de las plántulas**

Semilleros de poliestireno con 200 cavidades se llenaron con turba vegetal (Peat Moss; Sunshine® SS#3) humedecida a saturación con agua; se colocó una semilla a 1 cm de profundidad en cada cavidad. Los semilleros se mantuvieron en un invernadero y se aplicó riego diario con un aspersor manual. La unidad experimental consistió de 20 semillas y se evaluaron cinco repeticiones, de cada recolecta.

#### **2.4.3 Análisis estadístico**

Los resultados de las variables de calidad física se analizaron mediante ANDEVA y prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) con el programa estadístico del software MINITAB® 20.3. Los datos de la germinación se transformaron a arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción y se analizaron mediante ANDEVA, comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey ( $\alpha$

= 0.05). La representación gráfica de los datos se obtuvo con el programa SigmaPlot de Jandel Scientific (versión 11.0).

## 2.5 RESULTADOS

### 2.5.1 Calidad física

Las semillas mostraron diferencias significativas en la anchura, grosor, longitud y biomasa entre los sitios de recolecta. Las semillas de la localidad MAG fueron las más pesadas, pero mostraron anchura, grosor y longitud intermedia respecto a las de las otras localidades. Las semillas de la localidad AU con el grosor mayor, presentaron la anchura y longitud menores respecto a las otras localidades. Además, aunque las semillas de las localidades AU fueron más gruesas y las de la localidad SAA más anchas y largas, respecto a las de la localidad MAG, estas últimas pesaron 11.4 % más. En las diferencias de la biomasa de la semilla, su humedad no afectó, ya que, la variación entre 9.7 y 10 % no representó diferencia significativa entre las recolectas (Cuadro 2.1). La relación entre la longitud y la anchura de las semillas, con valores entre 1.16 y 1.18 mm mostró que las recolectas de *C. longirostrata*, de las tres localidades son casi cuadradas.

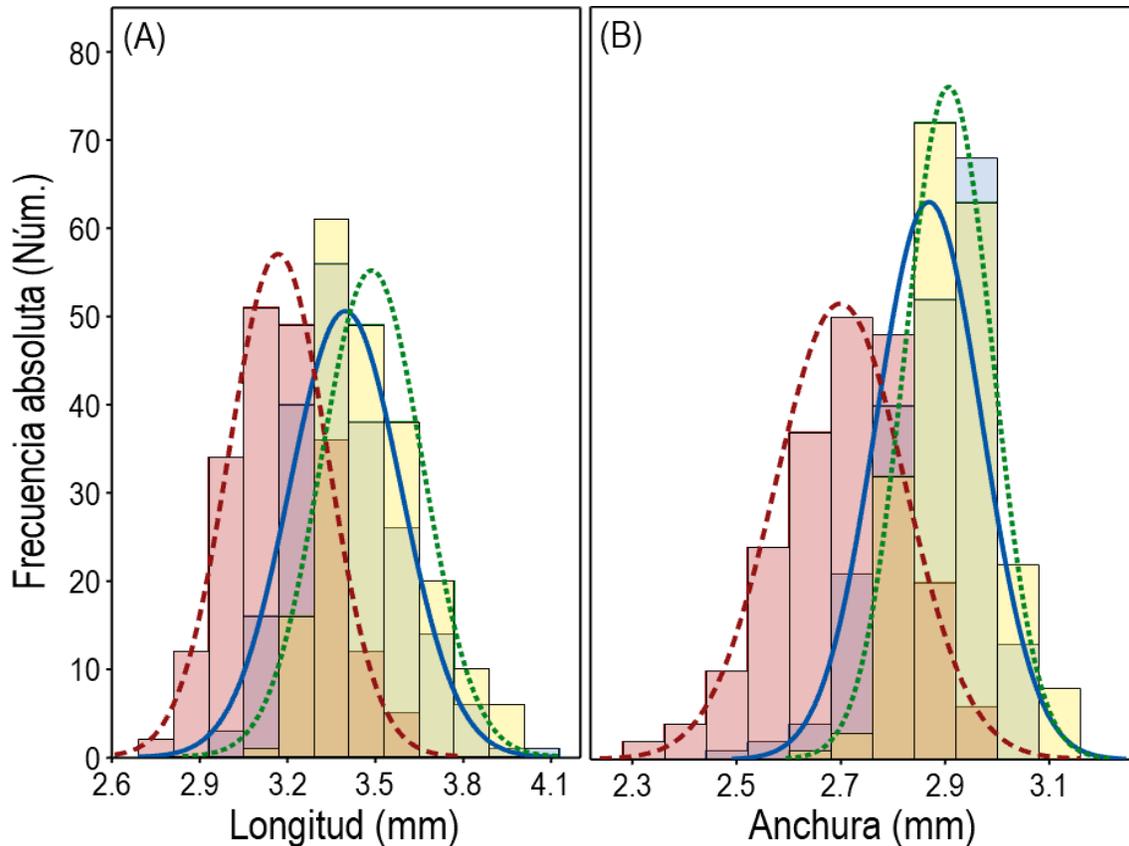
**Cuadro 2.1.** Anchura, grosor, longitud, biomasa ( $\pm$  E.E.) y humedad de semillas de chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook & Arn.) recolectadas en Ometepec, Guerrero, México.

Localidad	Anchura	Grosor	Longitud	Biomasa	Humedad
		(mm)		(mg)	(%)
AU	2.69 $\pm$ 0.006 c	1.52 $\pm$ 0.006 a	3.17 $\pm$ 0.008 c	8.90 $\pm$ 0.09 b	9.9
MAG	2.86 $\pm$ 0.006 b	1.42 $\pm$ 0.005 b	3.31 $\pm$ 0.008 b	10.27 $\pm$ 0.07 a	10.0
SAA	2.91 $\pm$ 0.005 a	1.26 $\pm$ 0.001 c	3.51 $\pm$ 0.008 a	8.90 $\pm$ 0.13 b	9.7

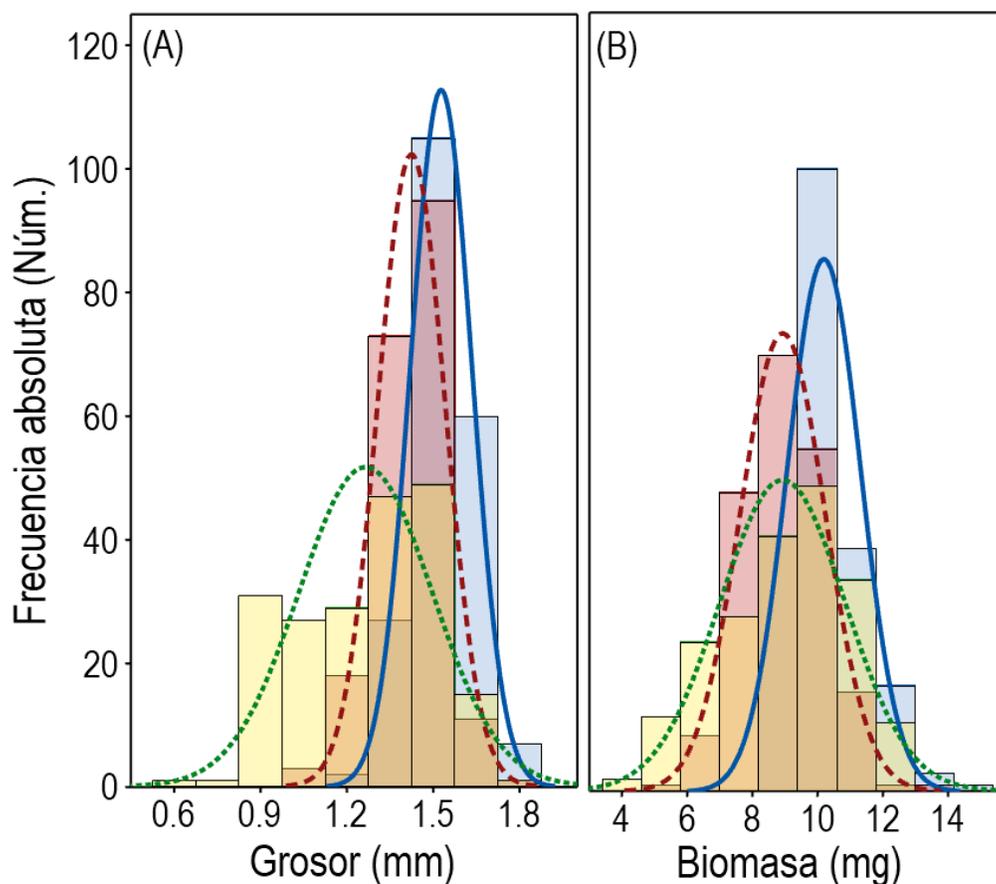
AU: con actividad urbana, MAG: con manejo agrícola y ganadero circundante y SAA: sin actividad antrópica. Valores seguidos con la misma letra dentro de columnas no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.5$ );  $n = 200$ .

La frecuencia absoluta de las dimensiones y de la biomasa de las semillas de las tres localidades describió una distribución normal, o cercanamente normal, en las cuatro características evaluadas; pero, las curvas de la distribución de la frecuencia de las cuatro variables mostraron la

abundancia relativa de semilla más largas alrededor de 3.4 mm (Figuras 2.1 A), más anchas alrededor de: 2.9 mm (Figura 2.1 B) de las semillas de las localidades MAG y SA. Además, en la recolecta MAG abundaron las semillas más gruesas (alrededor de 1.6 mm; Figura 2.2 A) y con biomasa mayor (alrededor de 10 mg; Figura 2.2 B) respecto a las de las localidades AU y SAA.



**Figura 2.1.** Frecuencia de la longitud (A) y anchura (B) de semillas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en localidades con: actividad urbana (barras y línea roja), manejo agrícola y ganadero (barras y línea azul) y sin actividad antrópica (barras y línea verde) de Ometepec, Guerrero, México (otros colores de algunas barras son resultado del traslape).



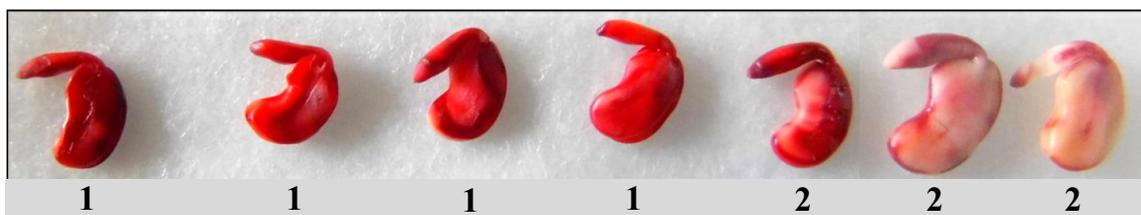
**Figura 2.2.** Frecuencia del grosor (A) y de la biomasa (B) de las semillas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en localidades con: actividad urbana (barras y línea roja), manejo agrícola y ganadero (barras y línea azul) y sin actividad antrópica (barras y línea verde) de Ometepepec, Guerrero, México (otros colores de algunas barras son resultado del traslape).

## 2.5.2 Calidad fisiológica

### 2.5.2.1 Viabilidad y vigor

Como resultado de la reacción del tejido de los embriones al tetrazolio se diferenciaron dos grupos, los viables con vigor alto y los inviables (Figura 2.3). Entre las recolectas hubo deferencia significativa en los dos tipos de embriones. Las recolectas de las localidades AU y MAG mostraron las proporciones significativamente mayores de embriones viables y vigorosos entre las tres

localidades; en promedio, la recolecta de la localidad SAA mostró alrededor de 40 % menos viabilidad respecto a AU y MAG (Cuadro 2.2).



**Figura 2.3.** Embriones de semillas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. teñidos con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio, viables con vigor alto (1) y poco o no viables (2).

**Cuadro 2.2.** Porcentaje ( $\pm$  E.E.) de viabilidad de embriones y germinación total (25 °C y oscuridad constante) de semillas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn., recolectadas en Ometepec, Guerrero, México.

Localidad de recolecta ♣	Viabilidad y vigor máximos %	Germinación total	
		Sin escarificar (%)	Escarificadas (%)
		AU	85 $\pm$ 2.89 a
MAG	91 $\pm$ 1.41 a	12 $\pm$ 1.6 a	93 $\pm$ 1.0 a
SAA	51 $\pm$ 4.04 b	4 $\pm$ 0.00 b	83 $\pm$ 3.0 b

♣ Localidad AU: con actividad urbana, MAG: con manejo agrícola y ganadero circundante y SAA: sin actividad antrópica. Valores en las columnas seguidos con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.5$ ).

### 2.5.2.2 Efecto de la temperatura en la germinación de las semillas

El efecto de la temperatura, entre 25 y 40 °C, de germinación en las semillas intactas fue significativamente diferente entre las localidades. Además, la germinación acumulada dependiente de esas temperaturas mostró tendencias diversas entre las recolectas (Figura 2.4; Cuadro 2.3). En las semillas de la recolecta AU, la germinación entre 25 y 40 °C mostró tendencia sigmoidea ( $y = a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$ ) y  $R^2$  altamente significativa, entre 0.5278 y 0.8939 (Cuadro 2.3). El inicio de la germinación (3 días) fue sincrónica en esas temperaturas; pero la germinación total se

incrementó en proporciones diferentes con el incremento de la temperatura. En estas semillas, la germinación total aumentó de 9 % con 25 °C al doble con 30 °C y a 21 y 32 % con 35 y 40 °C, respectivamente. Además, a 25 °C, la germinación total se presentó en 16 días y con las temperaturas mayores el tiempo aumentó a 27 o más días. Con estas variables la tasa de germinación media diaria fue menor (0.41 semillas día<sup>-1</sup>) con 25 °C e incrementó a 0.82, 0.91 y hasta 1.68 semillas día<sup>-1</sup> con 30, 35 y 40° C, respectivamente (Figura 2.4 A; Cuadro 2.4). Las semillas de esta localidad, como las de las otras dos, no germinaron a 45° C (Figura 2.4 A-C).

En las semillas de la localidad MAG, la germinación acumulada mostró tendencia sigmoidea con 25 y 30 °C ( $R^2$  altamente significativa de 0.8462 o mayor; Cuadro 2.3). Las tendencias de las curvas con 35 y 40 °C mostraron notable asincronismo durante los 34 días de evaluación y no correspondieron a algún ajuste simple y típico del crecimiento vegetal, como el exponencial, logístico o sigmoideo. En contraste, ambas curvas parecen describir tendencias doble sigmoideas (Figura 2.4 B). La germinación de las semillas de la localidad MAG inició sincrónicamente, al 5° día, con 25, 30 y 35 °C y disminuyó a 3 días con 40 °C. Las semillas de esta muestra incrementaron los porcentajes de germinación total con las temperaturas mayores a 25 °C, la excepción fue 45 °C, con la que no hubo germinación. Con 25 y 30 °C la máxima germinación fue 13 y 6 % y se presentó después de 23 y 22 días, respectivamente. En contraste, con 35 °C se observó la primera fase “estacionaria” de germinación alrededor de 20 % entre el 5° y vigésimo día, y la segunda fase, con la germinación máxima (34 %) se presentó después de 28 días. Con 40 °C, la tendencia fue similar la descrita con 35 °C (Figura 2.4 B). Independientemente de la tendencia de la germinación acumulada, las semillas de la localidad MAG incrementaron la germinación media diaria con la temperatura, desde 0.81 semillas día<sup>-1</sup> con 25 °C a 1.37 semillas día<sup>-1</sup> con 40 °C (Figura 2.4 B; Cuadro 2.4).

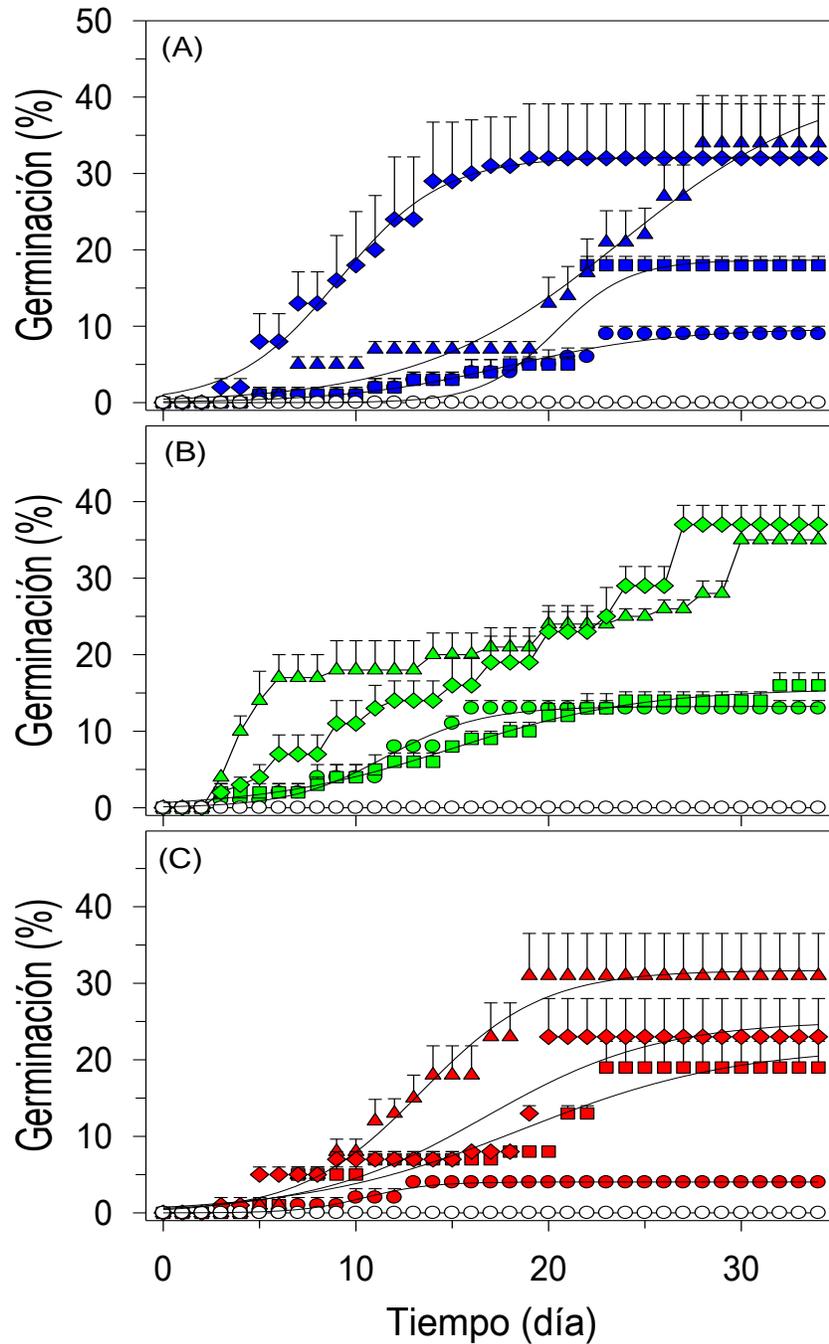
La germinación máxima de las semillas de la localidad SAA con 25, 30, 35 y 40 °C describió tendencias sigmoideas ( $y = a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$ ), con  $R^2$ , entre 0.6509 y 0.8055, altamente significativa (Cuadro 2.3). El inicio de la germinación disminuyó de 7 a 3 días con el incremento de la temperatura de 25 a 40 °C (Figura 2.4 C).

La germinación total de las semillas de la localidad SAA fluctuó entre 4 % con 25 °C y 31 % con 35 °C y disminuyó a 23 % con 40 °C. Además, el tiempo necesario para que la muestra mostrara esos valores varió con la temperatura, desde 4 días a 25 °C hasta 31 días con 35 °C. Los porcentajes de germinación total entre los 25 °C y 40 °C y el tiempo en el que se presentaron esos valores mostraron que la tasa de germinación media diaria varió de 0.38 semillas día<sup>-1</sup> con 25 °C a 1.63 semillas día<sup>-1</sup> con 35 °C (Figura 2.4 C; Cuadro 2.4). Las semillas de esta localidad, como las de las otras dos, no germinaron a 45° C (Figura 2.4 A-C).

**Cuadro 2.3.** Ecuaciones de las curvas ajustadas de germinación de semillas sin escarificar, de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn., recolectadas en Ometepec, Guerrero, México.

Localidad *	Temperatura (°C)		R <sup>2</sup> *
AU	25	$y = 9.69 / (1 + \exp(-(x - 17.98)/4.20))$	0.7606**
	30	$y = 18.66 / (1 + \exp(-(x - 20.36)/1.90))$	0.8939**
	35	$y = 42.29 / (1 + \exp(-(x - 23.81)/5.27))$	0.7884**
	40	$y = 32.15 / (1 + \exp(-(x - 9.11)/2.69))$	0.5278**
MAG	25	$y = 13.23 / (1 + \exp(-(x - 11.54)/2.49))$	0.8807**
	30	$y = 15.55 / (1 + \exp(-(x - 15.04)/4.87))$	0.8462**
	35	-	-
	40	-	-
SAA	25	$y = 4.04 / (1 + \exp(-(x - 10.49)/1.66))$	0.8055**
	30	$y = 21.77 / (1 + \exp(-(x - 18.60)/5.57))$	0.7443**
	35	$y = 31.68 / (1 + \exp(-(x - 13.41)/3.12))$	0.7442**
	40	$y = 25.10 / (1 + \exp(-(x - 16.72)/4.46))$	0.6509**

\* Ajustes con incremento sigmoideo de tres parámetros ( $f = a / (1 + \exp(-(x - x_0)/b))$ ) de la germinación de las semillas a 25, 30, 35 y 40 °C de las localidades AU: con actividad urbana, MAG: con manejo agrícola y ganadero circundante y SAA: sin actividad antrópica. \*\* Probabilidad altamente significativa del mejor ajuste.



**Figura 2.4.** Germinación acumulada (+ E.E.), dependiente de la temperatura 25, 30, 35, 40 y 45 ° C (círculos llenos, cuadros, triángulos o rombos, respectivamente), durante la germinación, de semillas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en localidades con actividad urbana (AU), con manejo agrícola y ganadero (MAG) y sin actividad antrópica (SAA) de Ometepec, Guerrero, México.

**Cuadro 2.4.** Efecto de la temperatura en la germinación y tasa de germinación de semillas, sin escarificar, de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn., recolectadas en Ometepec, Guerrero, México.

Localidad*	Temperatura	Germinación total (%)	Germinación media diaria (semillas día <sup>-1</sup> )
AU	25	9 c	0.41
	30	18 b	0.82
	35	34 a	1.21
	40	32 a	1.68
	45	0 e	0.00
MAG	25	13 bc	0.81
	30	16 b	0.50
	35	36 a	1.20
	40	37 a	1.37
	45	0 e	0.00
SAA	25	4 d	0.31
	30	19 b	0.83
	35	31 a	1.63
	40	23 b	1.15
	45	0 e	0.00

\*Localidades AU: con actividad urbana, MAG: con manejo agrícola y ganadero circundante y SAA: sin actividad antrópica.

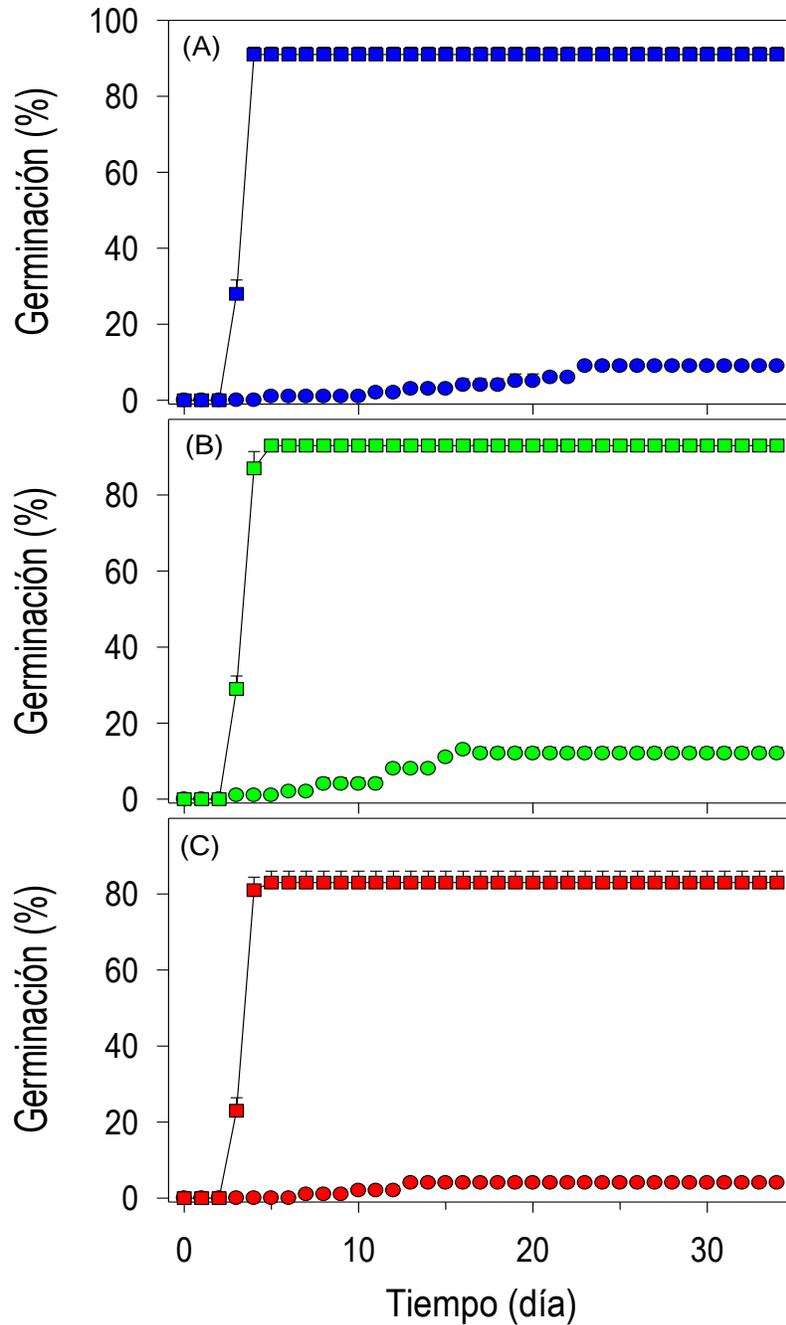
### 2.5.2.3 Efecto de la escarificación mecánica en la germinación de las semillas

La escarificación mecánica de las semillas generó diferencias significativas en su germinación respecto a las semillas intactas y entre las localidades. Las semillas intactas, de las tres localidades, con 25° C y en oscuridad mostraron entre 4 % de germinación total, las de la localidad SAA, y 12 %, las de la localidad MAG (Cuadro 2.2; Figura 2.5 A-B). El tiempo promedio en el que se obtuvieron esos valores fluctuaron entre 13 días en la recolecta de la localidad SAA y 23 d en las

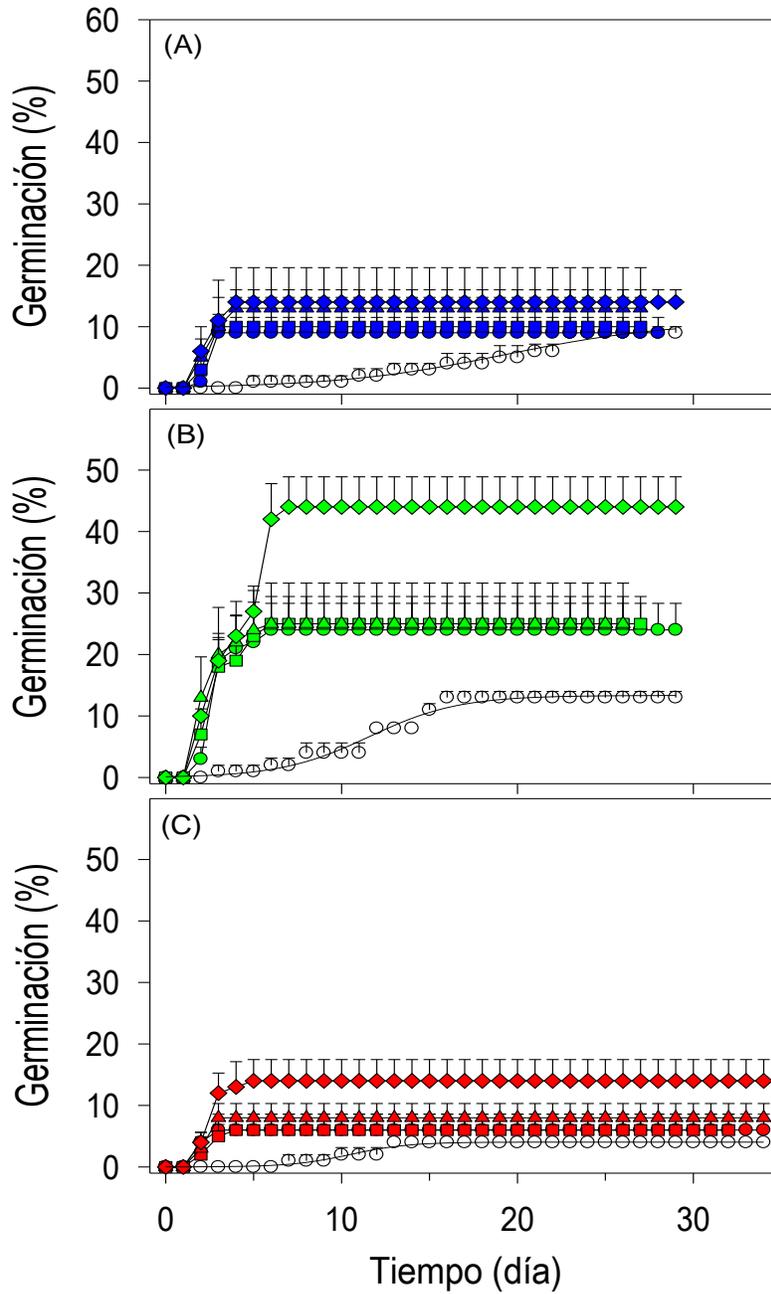
de la localidad AU. En contraste, la escarificación mecánicamente de las semillas, de las tres localidades, promovió el incremento significativo la germinación total entre siete y 20 veces (Cuadro 2.2). Además del incremento de la germinación total, la escarificación mecánica de las semillas aceleró la germinación abruptamente; con lo que la germinación media diaria cambió de 0.39 a 22.75 semillas día<sup>-1</sup> en la recolecta de la localidad AU, de 0.67 a 18.60 y de 0.31 a 16.60 semillas día<sup>-1</sup> en las recolectas de las localidades MAG y SAA, respectivamente (Figura 2.5 A-C).

#### **2.5.2.4 Efecto del envejecimiento acelerado de las semillas en su germinación**

El ambiente para evaluar el envejecimiento acelerado modificó la velocidad de germinación y la germinación total de las semillas de las tres localidades; además, el efecto dependió del tiempo de permanencia de las semillas en ese ambiente y fue evidente que en ningún caso el efecto del envejecimiento dañó las semillas y en consecuencia la germinación total, respecto a los testigos de cada localidad. Al respecto, las semillas de la localidad AU presentaron la germinación total entre 9 y 14 %, después de 24 a 96 h de envejecimiento acelerado, valores equivalentes al 12 % del testigo (Figura 2.6. A; Cuadro 2.5). Las semillas de la localidad MAG incrementaron la germinación total después de permanecer entre 24 y 96 h en el ambiente de envejecimiento acelerado, de 13 % en el testigo hasta 44 % con el tiempo mayor de envejecimiento acelerado (Figura 2.6. B; Cuadro 2.6). El efecto parcialmente similar se presentó en las semillas de la localidad SAA, aunque con cambios menores, pues el incremento fue de 4 % en el testigo a 14 % con la muestra envejecida durante 96 h (Figura 2.6. C; Cuadro 2.6).



**Figura 2.5.** Efecto de la escarificación mecánica en la germinación (+ *E.E.*) (cuadros), con 25 °C y oscuridad, de semillas intactas (círculos llenos) de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en localidades con actividad urbana (A), con manejo agrícola y ganadero (B) y sin actividad antrópica (C) de Ometepec, Guerrero, México.



**Figura 2.6.** Germinación a 25 °C y oscuridad de semillas, sin envejecimiento acelerado (círculos vacíos) o con envejecimiento acelerado durante 24, 48, 72 o 96 h (círculos llenos, cuadros, triángulos o rombos, respectivamente), de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn. recolectadas en Guerrero, México. Localidad con actividad urbana (A), con manejo agrícola y ganadero (B) y sin actividad antrópica (C).

**Cuadro 2.5.** Ecuaciones de las curvas ajustadas de germinación, con 25 °C y en oscuridad, de semillas, con envejecimiento acelerado, de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn., recolectadas en Ometepec, Guerrero, México.

Localidad *	Tiempo (horas)		R <sup>2</sup> *
AU	0	$y = 10.92 / (1 + \exp(-(x - 19.32)/4.76))$	0.7296**
	24	$y = 9.00 / (1 + \exp(-(x - 2.15)/0.07))$	0.6538**
	48	$y = 10.00 / (1 + \exp(-(x - 2.07)/0.08))$	0.3556**
	72	$y = 13.07 / (1 + \exp(-(x - 2.31)/0.49))$	0.2503**
	96	$y = 14.01 / (1 + \exp(-(x - 2.23)/0.23))$	0.8077**
MAG	0	$y = 13.34 / (1 + \exp(-(x - 11.59)/2.53))$	0.8816**
	24	$y = 23.07 / (1 + \exp(-(x - 2.55)/0.30))$	0.7012**
	48	$y = 24.20 / (1 + \exp(-(x - 2.56)/0.61))$	0.6662**
	72	$y = 24.09 / (1 + \exp(-(x - 2.03)/0.45))$	0.4608**
	96	$y = 46.08 / (1 + \exp(-(x - 3.93)/1.27))$	0.8462**
SAA	0	$y = 4.04 / (1 + \exp(-(x - 10.49)/1.66))$	0.8055**
	24	$y = 6.00 / (1 + \exp(-(x - 1.94)/0.08))$	0.3892**
	48	$y = 6.01 / (1 + \exp(-(x - 2.31)/0.41))$	0.3882**
	72	$y = 8.00 / (1 + \exp(-(x - 2.04)/2.04))$	0.5740**
	96	$y = 13.79 / (1 + \exp(-(x - 2.32)/0.36))$	0.5890**

\* Localidad AU: con actividad urbana, MAG: con manejo agrícola y ganadero circundante y SAA: sin actividad antrópica. Ajustes con incremento sigmoideo de tres parámetros ( $f = a / (1 + \exp(-(x - x_0)/b))$ ) de la germinación de las semillas sin escarificar que permanecieron antes de la germinación 0 h (testigo), 24 h, 48 h, 72 h o 96 h a 45 °C y HR de 100 %, en oscuridad. \*\* Probabilidad altamente significativa del mejor ajuste de la germinación acumulada.

**Cuadro 2.6.** Efecto del tiempo en envejecimiento acelerado (EA; con 41 °C, H.R. de 100 % y oscuridad) en la germinación de semillas de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arn., recolectadas en Guerrero, México.

Localidad*	EA (hora)	Germinación total (%)	Tiempo para germinación total (día)	Germinación media diaria (Semillas día <sup>-1</sup> )
AU	0 (testigo)	12	23	0.39
	24	9	3	3.00
	48	10	3	3.33
	72	13	4	3.25
	96	14	4	3.5
MAG	0 (testigo)	13	16	0.81
	24	19	3	6.33
	48	25	6	4.17
	72	25	6	4.17
	96	44	7	6.29
SAA	0 (testigo)	4	13	0.31
	24	6	3	2.00
	48	6	4	1.50
	72	8	3	2.70
	96	14	5	2.80

\* Localidad AU: con actividad urbana, MAG: con manejo agrícola y ganadero circundante y SAA: sin actividad antrópica.

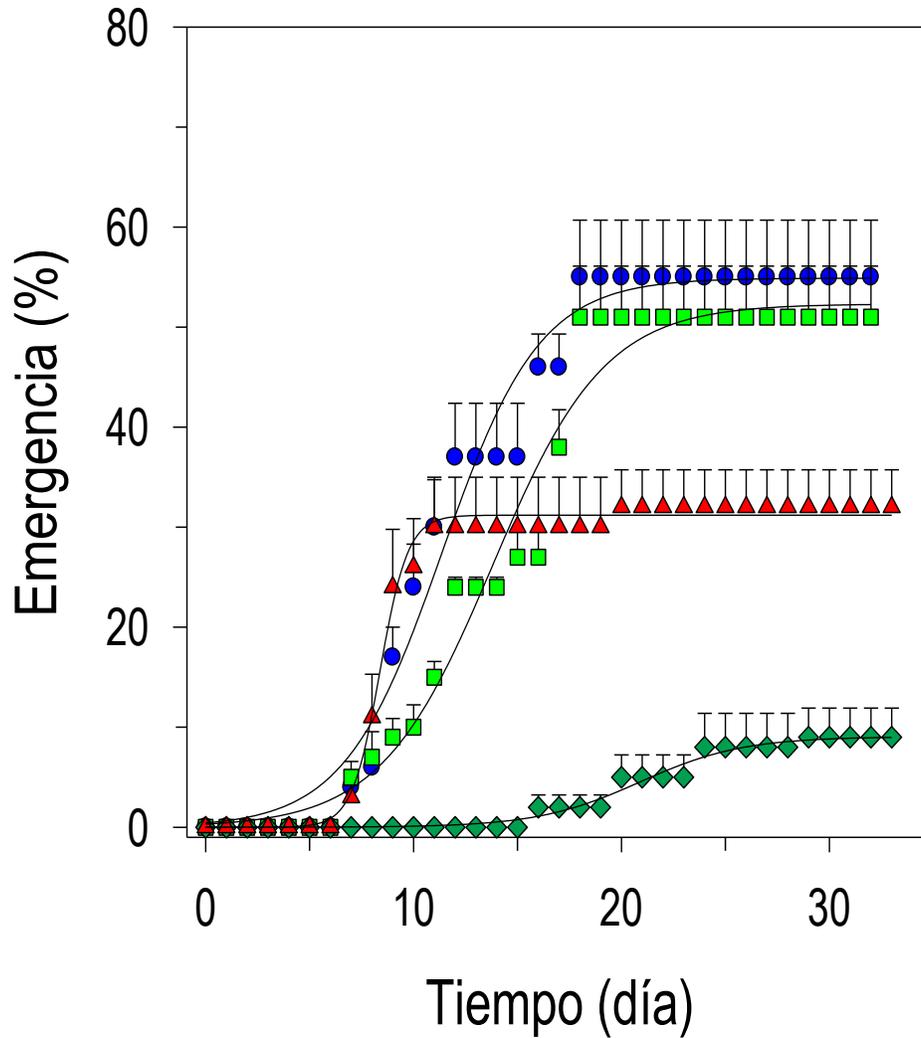
Además de lo descrito antes, la germinación se aceleró y el tiempo para la germinación total disminuyó de 23 días a 3 o 4 días en las semillas de la localidad AU, de 16 a 3, 6 o 7 días en la recolecta MAG y de 13 a 3, 4 o 5 días en la recolecta de la localidad SAA. Las modificaciones en las semillas por las condiciones del ambiente para el envejecimiento acelerado incrementaron la tasa diaria de germinación, respecto a los testigos, en todos los casos. En las semillas de la

localidad AU el incremento fue de 0.52 a 3.5 semillas día<sup>-1</sup> después de 96 h de envejecimiento acelerado. En las semillas de la localidad MAG el cambio fue de 0.81 a 6.3, también después de 96 h y en las semillas de la localidad SAA el incremento fue de 0,31 a 2.8 semillas día<sup>-1</sup> (Figura 2.6; Cuadro 2.6).

La germinación acumulada (25 °C y en oscuridad) de las semillas, de las tres localidades, después de 24, 48, 72 y 95 h en el ambiente para el envejecimiento acelerado mostró tendencia sigmoidea ( $y = a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$ ) en todos los casos, con R<sup>2</sup> altamente significativa; por lo que, no hubo diferencia con los testigos (Cuadro 2.5; Cuadro 2.6).

#### **2.5.2.5 Emergencia de las plántulas**

Debido a que las semillas escarificadas de las tres localidades incrementaron varias veces la germinación total con respecto a las semillas sin escarificar, la emergencia de las plántulas la evaluamos en las semillas escarificadas. Para fines comparativos también se incluyeron las semillas sin escarificar de una de las localidades. Estas últimas correspondieron a la localidad con manejo agrícola y ganadero (Figura 2.7). Las semillas escarificadas de las localidades con actividad urbana y con manejo agrícola y ganadero rindieron 55 y 51 % de emergencia de plántulas, respectivamente y sin diferencia significativa entre las dos localidades. El porcentaje de emergencia de plántulas de las semillas de la localidad sin actividad antrópica fue significativamente menor que el de las otras dos localidades.



**Figura 2.7.** Porcentaje de emergencia (+ E.E.) de plantas, en el sustrato y condiciones de invernadero, a partir de semillas escarificadas, recolectadas en localidades con actividad urbana (círculos), con manejo agrícola y ganadero (cuadros) y sin actividad antrópica (triángulos) de Guerrero, México. La emergencia (+ E.E.) de plántulas de semillas sin escarificar, de una localidad con manejo agrícola y ganadero (rombos), también se incluye.

## 2.6 DISCUSIÓN

Las diferencias en anchura, grosor y longitud de las semillas fueron significativas entre las localidades, pero no parecen prominentes y no mostraron una tendencia reconocible. La anchura y la longitud presentaron el gradiente SAA > MAG > AU; en el que, en promedio las semillas de la localidad AU fueron 1.3 y 7.6 % más anchas y 3.0 y 7.0 % más largas que las de MAG y AU. En el grosor la relación fue inversa, con el grosor de las semillas de SAA entre 6.6 y 17.1 % mayor respecto a las de MAG y SAA. Además, las semillas de la localidad MAG fueron las más pesadas, con 13.3 % más biomasa respecto a las otras localidades. Independientemente de las diferencias en las dimensiones, la relación entre la anchura y la longitud de las semillas, varió de 1.16 a 1.18 mm/mm; lo que mostró que las semillas de las tres localidades fueron ligeramente rectangulares.

La calidad de semilla es preponderante para implementar programas tecnológicos, y mejorar la producción y rentabilidad de los cultivos, ya que de ella depende la obtención de plantas vigorosas, resistentes a factores bióticos y abióticos (García-Nava *et al.*, 2000). En este sentido, el contenido de humedad de las semillas determina la velocidad de deterioro y su conservación durante el almacenamiento (Copeland y Mc Donald, 2001; ISTA, 2018). Las semillas de las localidades se cosecharon con humedad promedio (9.9 %) adecuada para almacenar y sembrar (ISTA, 2018). Al respecto, cuando las semillas presentan humedad menor a 10 %, la cubierta seminal o testa endurecida es impermeable al agua; si se mantiene con humedad mayor a 14 % puede permanecer permeable en semillas con latencia física (Baskin y Baskin, 2014). Además, un alto contenido de humedad favorece el desarrollo de insectos y hongos que podrían afectar la calidad física y fisiológica de la semilla (Copeland y Mc Donald, 2001). La longitud promedio de las semillas del presente estudio coincidió (3 y 3.2 mm) con las recolectadas en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla-Oaxaca, México (Soto-Estrada, 2004) y en el Bajío, México

(Rzedowski *et al.*, 2016); además, su biomasa promedio coincidió con aquellas recolectadas en Cuajinicuilapa, Guerrero (9.6 mg; Rojas-García *et al.*, 2021). En general, la biomasa de las semillas de Guerrero fue menor a la de una zona montañosa subtropical en Jalisco, México (15 mg; Zuloaga-Aguilar *et al.*, 2011). El tamaño de la semilla es un indicador de calidad fisiológica, que puede estar correlacionado positivamente con el vigor de las plántulas (Peña-Valdivia *et al.*, 2012).

Los factores que afectan el desarrollo y tamaño de las semillas son del tipo intrínsecos y extrínsecos a la planta, además de ser variados y numerosos, se ha señalado que los eventos moleculares y fisiológicos que conducen a la formación y desarrollo de las semillas se conocen parcialmente (Abid *et al.*, 2009). Al respecto, la forma en que la energía y los nutrientes se mueven a través de una planta y hacia una semilla en desarrollo es clave para garantizar la eficiencia de la producción y calidad física y fisiológica de las semillas. En estos procesos, el ambiente y el estrés abiótico son particularmente relevantes (Smith *et al.*, 2018). En relación con lo anterior, la precipitación promedio anual total (1310 y 1350 mm, respectivamente) y la distribución de la precipitación durante el año, son relativamente similares en las localidades MAG y AU, y parcialmente diferentes en SAA, ya que, la precipitación en esta última es hasta 25 % mayor. Además, la temperatura media (26.5 y 27 °C) y máxima (32.8 y 33.1 °C) anual son similares en las localidades MAG y AU, pero en SAA son hasta 5 °C menores (CONAGUA, 2021; Salinas *et al.*, 2022). Es probable que estas diferencias repercutan en la calidad física y fisiológica de las semillas y ayudan a explicar los contrastes entre las semillas de las localidades evaluadas.

En la calidad fisiológica de las semillas entre las localidades se reconocieron las siguientes similitudes y diferencias. Las semillas de las localidades AU no difirieron significativamente respecto a MAG en la viabilidad; pero, en promedio ambas mostraron 37 % mayor viabilidad

respecto a las de SAA. Estas últimas mostraron 49 % de viabilidad menor por lo que, podrían reactivarse o recuperarse fisiológicamente en ciertas condiciones pregerminativas o incluso durante la germinación. La viabilidad del embrión describe el nivel de su actividad metabólica y de las enzimas necesarias para la germinación de la semilla y el desarrollo de la plántula; un embrión puede tener tejido vivo y muerto, por lo que en las condiciones adecuadas puede germinar (Copeland y McDonal, 2001). Además, de las similitudes y diferencias ya descritas, el porcentaje de germinación total las semillas, en condiciones estándar (25 °C y oscuridad continua), de las localidades AU y MAG no difirieron entre sí y su promedio (10.5 %) fue más del doble que en SAA.

Los resultados mostraron que la temperatura óptima de germinación de las semillas varió parcialmente, entre 35 y 40 °C, en las recolectas de las tres localidades; además, que a 45 °C las semillas se dañaron después de varios días y no germinaron; incluso, al final de los 35 días que duró el ensayo las semillas estaban dañadas. Considerando la germinación total promedio con la temperatura estándar (25 °C) y la viabilidad máxima de los embriones con tetrazolio, se calcula que las semillas de las localidades AU y MAG presentan alrededor de 80 % de latencia. En la recolecta de la localidad SAA la latencia sería proporcionalmente menor si se considera que sólo 51 % de los embriones mostraron viabilidad y vigor máximo. La latencia externa o física de semillas de *C. longirostrata* recolectadas en Oaxaca, Tabasco y Guerrero ya fue documentada (Ayala-Herrada *et al.*, 2010; Garduza-Acosta *et al.*, 2020; Rojas-García *et al.*, 2021). En este estudio, la escarificación mecánica eliminó esa proporción de latencia en las tres recolectas; además, promovió la germinación en cierta proporción de las semillas con vigor bajo de la recolecta de la localidad SAA. Junto con la eliminación de la latencia, la escarificación mecánica aceleró la germinación y su porcentaje máximo se obtuvo entre 8 y 19 días antes que en los testigos;

además, la escarificación mecánica también incrementó la emergencia de las plántulas. La latencia parcial o total de las semillas de *C. longirostrata* se ha eliminado mediante la escarificación con ácido sulfúrico concentrado, durante algunos minutos y hasta una hora (Ayala-Herrada *et al.*, 2010; Garduza-Acosta *et al.*, 2020; Rojas-García *et al.*, 2021). Debido al tamaño de las semillas de la especie, Ayala-Herrada *et al.* (2010) recomendaron la escarifican con ácido; sin embargo, el costo, el riesgo del manejo y de los residuos del ese compuesto restringen su uso en la experimentación. Un enfoque alternativo para la producción de cantidades abundantes de plantas es incrementar la densidad de siembra; al respecto, la disponibilidad de semilla no está restringida, ya que una planta en su ambiente natural produce miles de semillas, más de 3000 y hasta cerca de 11 000, de acuerdo con Salinas *et al.* (2022).

El ambiente (41 °C, H.R. de 100 % y oscuridad) de la prueba de envejecimiento acelerado disminuyó parcialmente la latencia, en proporciones variables entre las recolectas y entre los tratamientos (recolecta x tiempo). Después de 24 a 96 h en esas condiciones, la recolecta de la localidad MAG mostró la respuesta mayor, con 25 y hasta cerca de 50 % de germinación. Además, con las condiciones del envejecimiento aceleraron la germinación de todos los tratamientos y la germinación total se obtuvo entre 8 y 19 días antes que en los testigos sin envejecer. El efecto del calor húmedo previo a la germinación fue parcialmente similar al que produjo el remojo con agua a 70 °C (con enfriamiento naturalmente) o a 100 °C durante 1 min en semillas de *C. longirostrata* recolectadas en Guerrero (Rojas-García *et al.*, 2021) o a 80 °C, durante 1 min, en las recolectadas en Tabasco (Garduza-Acosta *et al.*, 2020).

La prueba de envejecimiento acelerado, con calor húmedo, propuesta por Delouche y Baskin (1973), aplicada en el presente estudio, asemeja el proceso natural de senescencia de las semillas. La senescencia natural o por almacenamiento de las semillas a largo plazo influye

negativamente en la germinación y el crecimiento de las plántulas. Además, la velocidad de deterioro de las semillas depende de las condiciones ambientales en las que se desarrollaron; ya que, las semillas en ambientes adversos pierden rápidamente la viabilidad de germinación y la longevidad (Reed *et al.*, 2022). Los cambios internos incluyen: aumento de la concentración de radicales libres, daño de los lípidos de las membranas, inactivación de enzimas, daño de las proteínas de almacenamiento y del ADN (Bewley y Black 2012). Por lo que, el deterioro de las semillas durante la senescencia natural o artificial (almacenamiento inadecuado) es un fenómeno irreversible (Lamichaney y Maity, 2021). En este sentido, las tendencias al calentamiento global y el aumento de la variabilidad de la temperatura ambiente pueden aumentar la latencia de las semillas y reducir las tasas de germinación (Reed *et al.*, 2022). El envejecimiento acelerado, a 41 °C y 100 % H.R., durante 72 y 96 h deterioró las semillas de *C. juncea* L. (Silva *et al.*, 2017) y de *Dendrocalamus strictus*, en las que la concentración de azúcares, almidón, proteínas y lípidos, y la actividad de la peroxidasa y la fosfatasa ácida y alcalina decayeron (Ravikumar *et al.*, 2002). La prueba de envejecimiento acelerado altera irreversible el metabolismo de las semillas, por acumulación de especies reactivas de oxígeno ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^-$ ), que son altamente reactivas y tóxicas, ya que degradar proteínas, carbohidratos y lípidos, dañan las membranas celulares y los ácidos nucleicos, provocando daños en el embrión (Copeland y McDonal, 2001; Sharma *et al.*, 2012; Önder *et al.*, 2020). Por lo anterior, la pérdida parcial de la latencia de las semillas de *C. longirostrata* con el incremento significativo de la germinación total y la disminución del tiempo para su inicio fue destacable en este estudio. Al respecto, la latencia de las semillas de esta especie parece del tipo externo (Ayala-Herrada *et al.*, 2010); ya que, la pérdida de este carácter es atribuible al daño o alteración física (abrasión con lija) o química de la testa (alteración de su

impermeabilidad por degradación o eliminación con calor húmedo o con ácido sulfúrico concentrado).

## 2.7 CONCLUSIONES

- Las semillas de *C. longirostrata*, de tres localidades del estado de Guerrero, difieren parcialmente en sus características físicas y biomasa. Las semillas, de la localidad con manejo agrícola y ganadero circundante presentan la biomasa mayor respecto a las semillas de las localidades con actividad urbana y sin actividad antrópica, pero no fueron más grandes, ya que su anchura, grosor y longitud son intermedios.
- La viabilidad de las semillas es óptima, excepto en la recolecta sin actividad antrópica. No obstante, el porcentaje de la germinación promedio de las semillas de las tres localidades es del 90 %.
- Las semillas de las tres localidades incluyen una proporción de hasta 80 % con latencia; su respuesta a la escarificación y al calor húmedo previo a la germinación, permite sugerir que la latencia de estas semillas es física.
- La temperatura óptima para la germinación de las semillas de *C. longirostrata* es entre 35 y 40 °C; temperaturas menores inhiben parcialmente la germinación de las semillas no latentes y la inhibición es total, a 45 °C debido al daño por calor de la semilla.
- El ambiente con temperatura alta y H.R. de 100 %, propio para evaluar el envejecimiento acelerado de las semillas, puede cuadruplicar la germinación y disminuir, hasta siete veces, el tiempo para la germinación total de las semillas de las tres localidades. La respuesta depende del tiempo, entre 24 y 96 h, de exposición de la semilla a esas condiciones y de la localidad de origen.

- La emergencia de las plántulas de esta especie puede ser entre 30 y 60 % con semillas escarificadas, en dependencia de la localidad de origen.

**CAPITULO III. EFECTO DE LA PODA Y DE CITOCININA EXÓGENA EN LA  
PRODUCCIÓN DE FOLLAJE DE PLANTAS DE *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.  
CULTIVADAS EN INVERNADERO**

**3.1 RESUMEN**

Las hojas frescas de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. (Chipilín) son alimento para humanos desde la época prehispánica; actualmente, se comercializa el follaje de plantas silvestres. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la poda y de citocinina bencilaminopurina (BAP) exógena en la producción de follaje de *C. longirostrata* cultivada en invernadero. La hipótesis fue que la poda y BAP exógena separadas o combinadas promueven la producción de follaje en la etapa vegetativa. Para obtener los siguientes seis tratamientos, las plantas cultivadas en invernadero, con 26-28 cm de altura, intactas o podadas se asperjaron con 120 mL por planta (cada 15 d, hasta completar tres aplicaciones) con agua o la mezcla acuosa respectiva: (1) testigo, (2) DMSO (dimetilsulfóxido, 300  $\mu$ L) + tween (50  $\mu$ L), (3) poda (de 4 cm del ápice del tallo) + DMSO + tween, (4) poda, (5) poda + BAP y (6) BAP. La citocinina (30 mg) se disolvió en 300  $\mu$ L de DMSO y 50  $\mu$ L de tween 20 se adicionaron para romper la tensión superficial. El diseño experimental fue de bloques completos al azar, con cuatro repeticiones y una planta como unidad experimental. Las evaluaciones fueron número de ramas sobre el tallo, número de hojas verdes por planta, área foliar, biomasa fresca y seca de ramas, foliolos, peciolo y raíz. Con estos datos se calculó la tasa de crecimiento absoluto del cultivo (TCA) y de asimilación neta (TAN). Las evaluaciones se hicieron 15, 30, 45 y 60 d después de iniciar las aspersiones. El número de ramas y hojas incrementó linealmente en los 60 d de cultivo; aunque, la biomasa fresca de las ramas y los foliolos, junto con el área foliar y la TCA decayeron después de 45 d en el testigo. Con la poda ninguna de las variables evaluadas superó al testigo durante los 60 d. La BAP exógena promovió

el incremento lineal de ramas (núm. y biomasa), hojas y folíolos (núm., biomasa y área) y TCA en el periodo de evaluación; además, el incremento del follaje y de la TCA fue hasta el triple respecto al testigo en ese periodo. Además, la combinación de la poda + BAP superó parcialmente al tratamiento con la citocinina sola, pues las plantas generaron más hojas, con folíolos más pesados y TCA hasta cerca de 50 % mayor en 60 días respecto a BAP. La producción de follaje de *C. longirostrata* es posible mediante el cultivo en invernadero y puede triplicarse con BAP exógena y la combinación con poda temprana del tallo favorece aún más esa producción.

**Palabras clave:** folíolos, hojas, ramas, tasa de asimilación neta, tasa media de crecimiento.

### 3.2 ABSTRACT

Fresh leaves of *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. (Chipilín) are food for humans since pre-Hispanic times; currently, the foliage of wild plants is commercialized. The aim of the study was to evaluate the effect of pruning and exogenous benzylaminopurine (BAP) cytokinin on foliage production of greenhouse-grown *C. longirostrata*. The hypothesis was that separately or in combination pruning and exogenous BAP promote foliage production in the vegetative stage. To obtain the following six treatments, intact or pruned 26-28 cm tall plants growing in greenhouse, were sprayed with 120 mL per plant (every 15 d, until completing three applications) with water or the respective aqueous mixture. (1) Control, (2) DMSO (dimethylsulfoxide, 300  $\mu$ L) + tween (50  $\mu$ L), (3) pruning (4 cm from stem apex) + DMSO + tween, (4) pruning, (5) pruning + BAP and (6) BAP. Cytokinin (30 mg) was dissolved in 300  $\mu$ L DMSO and 50  $\mu$ L tween 20 were added to break surface tension. The experimental design was randomized complete blocks, with four replications and one plant as experimental unit. The evaluations include number of branches on the stem, number of green leaves per plant, leaf area, fresh and dry biomass of branches, leaflets, petioles and root. With these data, the absolute growth rate of the crop (TCA) and the net assimilation rate (TAN) were calculated. The evaluations were made 15, 30, 45, and 60 d after first spraying. The number of branches and leaves increased linearly in the 60 d of cultivation; although, the fresh biomass of the branches and leaflets, together with the leaf area and the TCA, decreased after 45 d in the control. With pruning, none of the evaluated variables exceeded the control during the 60 d. The exogenous BAP promoted the linear increase of branches (number and biomass), leaves and leaflets (number, biomass and area) and TCA in the evaluation period; In addition, the increase in foliage and TCA was up to triple compared to the control in that period. The combination of pruning + BAP exceeded the control in foliage production from 15 days and the

greatest significant differences were identified at 60 days, with values up to three times higher in the evaluated foliage components. In addition, the combination of pruning + BAP partially outperformed the treatment with cytokinin alone, since the plants generated more leaves, with heavier leaflets and TCA up to about 50% higher in 60 days. Foliage production of *C. longirostrata* is possible by greenhouse cultivation and can be tripled with exogenous BAP and the combination with early stem pruning further enhances such production.

**Keywords:** leaflets, leaves, branches, net assimilation rate, average growth rate.

### 3.3 INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales, tienen la capacidad de modificar su desarrollo, fisiología e historia evolutiva de acuerdo con las condiciones ambientales, el fenotipo y el genotipo, a esto se le conoce como plasticidad (Sultan, 2000; Gratani, 2014). La adaptación por plasticidad es un fenómeno generalizado y relevante en las especies vegetales y ha evolucionado diferente entre las especies. El estímulo que causa estas modificaciones puede ser directo, es decir el factor ambiental está presente cuando ocurre la adaptación, o puede ser indirecto, es decir el estímulo ambiental que no forma parte de aquel en el que ocurre la adaptación (Bradshaw, 1965; Sussex y Kerk, 2001). Por lo tanto, la plasticidad es parte esencial de la adaptación de las plantas domesticadas y silvestres.

La poda, despunte o defoliación que implica la eliminación selectiva de una estructura de la planta, como ramas, hojas, brotes o raíces han mostrado que el hábito de crecimiento puede modificarse y se hace con objetivos diversos, pero frecuentemente es para aumentar la calidad de los cultivos y de árboles frutales (Khan *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2018) así como para controlar plagas y enfermedades (Eyles *et al.*, 2013; Ponmurugan *et al.*, 2019). Estas técnicas se han utilizado en horticultura para asegurar y regular la producción y el rendimiento (Kumar *et al.*, 2017; Schupp *et al.*, 2017). Al respecto, en plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) se ha documentado una disminución de 7 y 30 % del rendimiento de tubérculo cuando se realizan una y tres podas (Sunitha *et al.*, 2015). En contraste, la remoción del sexto y octavo meristemo apical del tallo principal de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) incrementó el número de ramas laterales y flores; esto no afectó la calidad fisiológica del fruto o las semillas (Nakada-Freitas *et al.*, 2019). En el caso de la hierba cicutaria (*Anthriscus sylvestris* L.) la eliminación de tallos florales maduros promovió la formación de nuevos tallos y la eliminación al inicio de la floración puede estimular la producción de flores y disminuir la proliferación vegetativa (Van-Mierlo y Van-Groenendael, 1991).

Las podas vegetativas a 1.5 m de altura en *Acacia saligna* (Labill.) H.L. Wendl, con 30 % de disminución de la altura, promovió disminución del contenido de azúcares solubles, P, Mn y NO<sub>3</sub> en la raíz (Peter y Lehmann, 2000). En plantas de camote (*Ipomoea batatas* L.) un corte apical aumentó las dimensiones de la raíz y un corte basal la disminuyó hasta 20 % (Netsai *et al.*, 2019). En contraste, la eliminación del 10 % de ramas de plantas de *Amaranthus cruentus* L. incrementó al doble la biomasa de tallo; además, la longitud de ramas primarias, el número de ramas secundarias y la biomasa de las semillas también se incrementaron (Martínez-Moreno *et al.*, 1999). En el caso de *A. hypochondriacus* L. el tratamiento similar al anterior, disminuyó la biomasa de las hojas (Martínez-Moreno *et al.*, 1999). Además de los efectos anteriores, la poda se ha reconocido como una acción para el ahorro de agua, ya que reduce la transpiración de las plantas y modifica su morfología (Alcorn *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2018).

La capacidad fisiológica y bioquímica de las plantas para regular su crecimiento es amplia y está modulada por las hormonas vegetales. Estas son moléculas señalizadoras que se sintetizan, movilizan y tienen efecto en diferentes tejidos, cuya concentración es específica para el proceso que regulan (Bishop *et al.*, 2015; Porta y Jiménez, 2019). Algunos de esos procesos son la división celular, el crecimiento, la diferenciación de los órganos (vegetativos, reproductivos y de las raíces), también, regulan la embriogénesis, la germinación de las semillas, la senescencia y la defoliación en respuesta a estrés biótico o abiótico (Bishop *et al.*, 2015; Porta y Jiménez, 2019). Se han descrito 11 tipos de hormonas vegetales de las cuales cinco (giberelinas, ácido abscísico, citoquininas, auxinas y etileno) se relacionan con la fisiología del crecimiento de las plantas (Bishop *et al.*, 2015).

Por ejemplo, 200 mg L<sup>-1</sup> de bencilaminopurina (BAP), como fuente de citocinina, aplicados al cultivo de alcachofa (*Cynara cardunculus* L. var. *Scolymus* (L.) Benth) aumentaron 49 % la

emisión de brotes vegetativos en comparación con el control; sin embargo, se afectó la calidad, ya que la concentración de los minerales se alteró (Riahi *et al.*, 2019). En el caso de las plantas de alegría guineana (*Impatiens hawkeri* Bull) asperjadas con BAP (100 mg L<sup>-1</sup>) el área foliar incrementó (335 cm<sup>2</sup> por planta) en comparación con el control (140 cm<sup>2</sup> por planta), por lo que la biomasa acumulada también incrementó (Molinari *et al.*, 2019).

La mezcla de BAP y ácido naftalenacético (ANA; 5.5 µM) aplicada al medio de cultivo incrementó el número de brotes vegetativos (8-10 brotes) y la composición química de carbohidratos no se vio afectada; sin embargo, la concentración de monoterpenos oxigenados y aromáticos fue menor en comparación con la del grupo control (Lazzarini *et al.*, 2019). La citocinina exógena aplicada al follaje ha mostrado efectividad para contrarrestar alteraciones negativas en cultivos hortícolas, pero los procesos fisiológicos involucrados no muestran una tendencia similar (Carnelos *et al.*, 2022).

Los efectos de la eliminación de la parte apical de la planta (decapitación) y la aplicación de citoquinina, giberelinas o auxinas exógenas en *C. longirostrata* no se han documentado. Esta especie, conocida también como Chipilín, se desarrolla en clima tropical y forma parte de la familia de las leguminosas, su follaje, principalmente de rodales silvestres, se utiliza para preparar alimentos, bebidas y en herbolaria (Basurto-Peña, 2011). Las hojas jóvenes se consumen como verdura, principalmente en el suroeste de México (Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Tabasco y Veracruz) (Linares y Bye, 2015). El follaje joven de las plantas con 80 a 90 cm de altura se cosecha con la finalidad de venderlo en manojos en los mercados locales. Los cortes modifican la morfología de la planta, por lo que con cada corte el agricultor-recolector busca modificar el crecimiento natural de acuerdo a sus necesidades (observación personal durante los recorridos para muestrear plantas y semillas). Los cambios en la morfología o el crecimiento de las plantas de

Chiplilín en respuesta a la poda o la combinación de la poda con alguna hormona de crecimiento no se han documentado. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la poda y citocinina (BAP) exógena en la producción de follaje de plantas de *C. longirostrata* cultivadas en invernadero. La hipótesis fue que la poda y BAP exógena separadas o combinadas promueven el incremento del follaje de plantas de *C. longirostrata* en etapa vegetativa.

## 3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.4.1 Sitio del estudio

El estudio se realizó de abril a agosto de 2021, en invernadero con cubierta plástica, en Montecillo, Texcoco, Estado de México (19° 29" N y 98° 53" O, y 2250 m s. n. m.). El clima de la región, de acuerdo con la clasificación de Köppen, modificado por García (2005), es Cw, que corresponde al templado con lluvias en verano.

### 3.4.2 Material para el estudio

Las plantas se obtuvieron de semillas de *C. longirostrata* recolectadas de poblaciones silvestres, en la localidad Las Vigas, Ometepec, Guerrero, México (16° 40' 264" N, 98° 27' 502" O y 264 m s.n.m.; CONAGUA, 2021) en noviembre de 2020. Las semillas escarificadas, en el lado opuesto al eje hipocótilo, con una lija del número 80, se sembraron en semilleros de poliestireno, con 200 cavidades con turba vegetal (Peat Moss; Sunshine® SS#3) humedecida a saturación con agua; se colocó una semilla, a 1 cm de profundidad, en cada cavidad.

Treinta días después de la emergencia, dos plántulas se trasplantaron en macetas (color negro) de vivero, con 10 kg de suelo agrícola del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. El análisis químico del suelo reveló las siguientes características: suelo tipo arena migajosa, con pH 7.1, 0.28 % de materia orgánica, contenido alto de nitrógeno de 0.80 %, y contenido bajo de calcio, fósforo y potasio con 3.0 cmol(+) kg<sup>-1</sup>, 3.5 cmol(+) kg<sup>-1</sup> y 0.024 cmol(+) kg<sup>-1</sup>, respectivamente. La temperatura y humedad relativa en el invernadero se registraron con un sistema automatizado recolector de datos (data logger) (Figura 3.1).

### 3.4.3 Tratamientos y diseño experimental

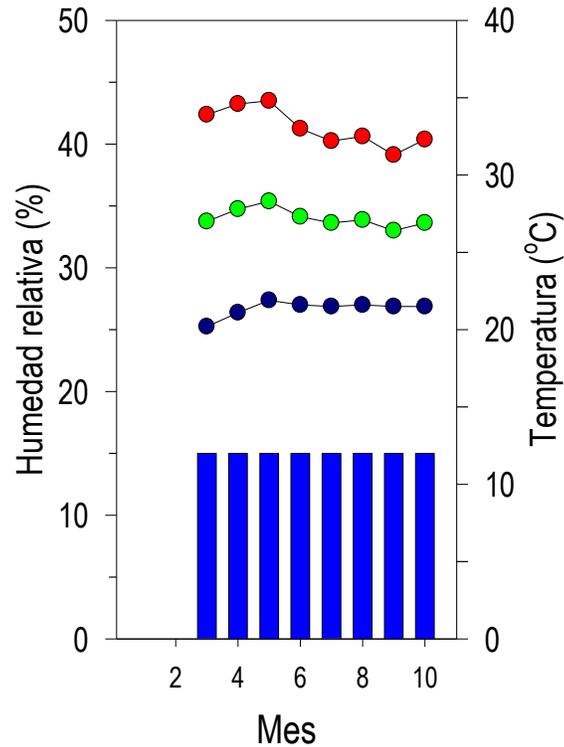
El estudio incluyó seis tratamientos, resultantes de la combinación de los testigos, un regulador de crecimiento exógeno y la poda apical. Tratamiento (1): testigo absoluto, plantas sin aplicación de regulador de crecimiento ni poda. Tratamiento (2): mezcla de disolvente, dimetilsulfóxido (DMSO) del regulador de crecimiento y vehículo o coadyuvante (DMSO + tween 20) en concentraciones similares a las utilizadas para disolver el regulador de crecimiento y su aplicación a las plantas). Tratamiento (3): poda apical + DMSO + tween. Tratamiento (4): poda apical. Tratamiento (5): poda apical + BAP 30 mg/L. Tratamiento (6): 6-bencilaminopurina (BAP, Sigma-Aldrich®) en concentración de 30 mg/L.

La BAP se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®) en proporción 30 mg de BAP a 300 µL de DMSO (p:v). A esta mezcla se agregaron dos gotas (50 µL aprox.) de tween 20 (Boehringer Mannheim GmbH); este último se aplica para romper la tensión superficial y facilitar la penetración del regulador de crecimiento a través de la cutícula hacia la epidermis y células del mesófilo de la hoja (Wilson-García *et al.*, 2008). Las plantas del tratamiento uno o testigo y del tratamiento cuatro o poda apical absoluta se asperjaron con volúmenes de agua destilada similares a los utilizados para los otros tratamientos.

Las aspersiones se hicieron cuando más del 50 % de las plantas tenían entre 26 y 28 cm de altura, con un aspersor manual (120 mL por planta), cubriéndose completamente el vástago, entre las 18:00 y 20:00 h, cada 15 días, hasta completar tres aspersiones.

La poda consistió en la eliminación de 4 cm del ápice del tallo de las plantas cuando tenían entre 26 y 28 cm de altura. El corte se hizo con tijeras para poda (Truper, acero inoxidable) entre las 17:00-18: 00 h para disminuir la deshidratación por el corte.

Las evaluaciones se hicieron en plantas cosechadas 15, 30, 45 y 60 días después de hacer las aspersiones. El diseño experimental fue de bloques completos al azar, con cuatro repeticiones y una planta como unidad experimental.



**Figura 3.1.** Humedad relativa (barras azules), temperaturas promedio mínima (círculos azules), media (círculos verdes) y máxima (círculos rojos) mensual en el invernadero en Montecillos, Texcoco Estado de México, hasta el inicio de floración de plantas de *C. longirostrata*. Mes 2: febrero, ..., 10: octubre.

#### 3.4.4 Riego y fertilización

El riego se aplicó con un sistema en líneas con goteros antidrenaje, y dos estacas por maceta. Las plantas fueron fertilizadas con la solución nutritiva Steiner (1984), los primeros 20 días después de la aplicación de los tratamientos.

### 3.4.5 Variables evaluadas

Las variables evaluadas fueron el número de ramas sobre el tallo, número de hojas verdes por planta, área foliar (sin incluir los peciolos) determinada con un integrador de área foliar (LI-COR, 3100), medida en cm<sup>2</sup>.

También se cuantificó la biomasa fresca y seca de ramas, folíolos y peciolos, determinada en una balanza de precisión (Precisa, XB-2200C, precisión 0.01 g).

La biomasa seca se obtuvo después de mantener los tejidos ya mencionados y la raíz a 50 °C, en horno con circulación forzada de aire (BLUE M Island, Illinois U.S.A.), hasta obtener el peso constante de los tejidos (aproximadamente 96 h). Con estos datos se calculó la tasa media de crecimiento absoluto del cultivo (TCA) y asimilación neta (TAN), mediante las ecuaciones siguientes (Escalante y Kohashi, 2015):

$$TCA = \frac{BS_2 - BS_1}{t_2 - t_1}$$

$$TAN = \left( \frac{BS_2 - BS_1}{AF_2 - AF_1} \right) \left( \frac{\ln AF_2 - \ln AF_1}{t_2 - t_1} \right)$$

Donde: BS<sub>2</sub> y BS<sub>1</sub> representan la biomasa seca final y la biomasa inicial, AF<sub>2</sub> y AF<sub>1</sub> representan el área foliar final y área foliar inicial; *ln* = logaritmo natural de AF<sub>2</sub> y AF<sub>1</sub> en los tiempos t<sub>2</sub> y t<sub>1</sub>, respectivamente, y expresado en g día<sup>-1</sup>.

### 3.4.6 Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se usó el procesador MINITAB® 20.3, se realizó ANDEVA y prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), para comparar los tratamientos por

muestreo. La representación gráfica de los resultados se obtuvo con el programa SigmaPlot de Jandel Scientific (versión 11.0).

## 3.5 RESULTADOS

### 3.5.1 Número de ramas

El número de ramas por planta en el testigo incrementó ( $P \leq 0.05$ ) de siete a 85 en 60 días de crecimiento. Con excepción del tratamiento poda, en los otros tratamientos, incluido poda + BAP, el número de ramas incrementó durante los 60 días. El número promedio de ramas por planta varió ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos a los 15, 30, 45 y 60 días de crecimiento. Los tratamientos DMSO + tween, poda + DMSO + tween y BAP mostraron el incremento mayor en ese periodo total de 60 días, respecto al testigo, con 150 ramas en promedio (Figura 3.2).

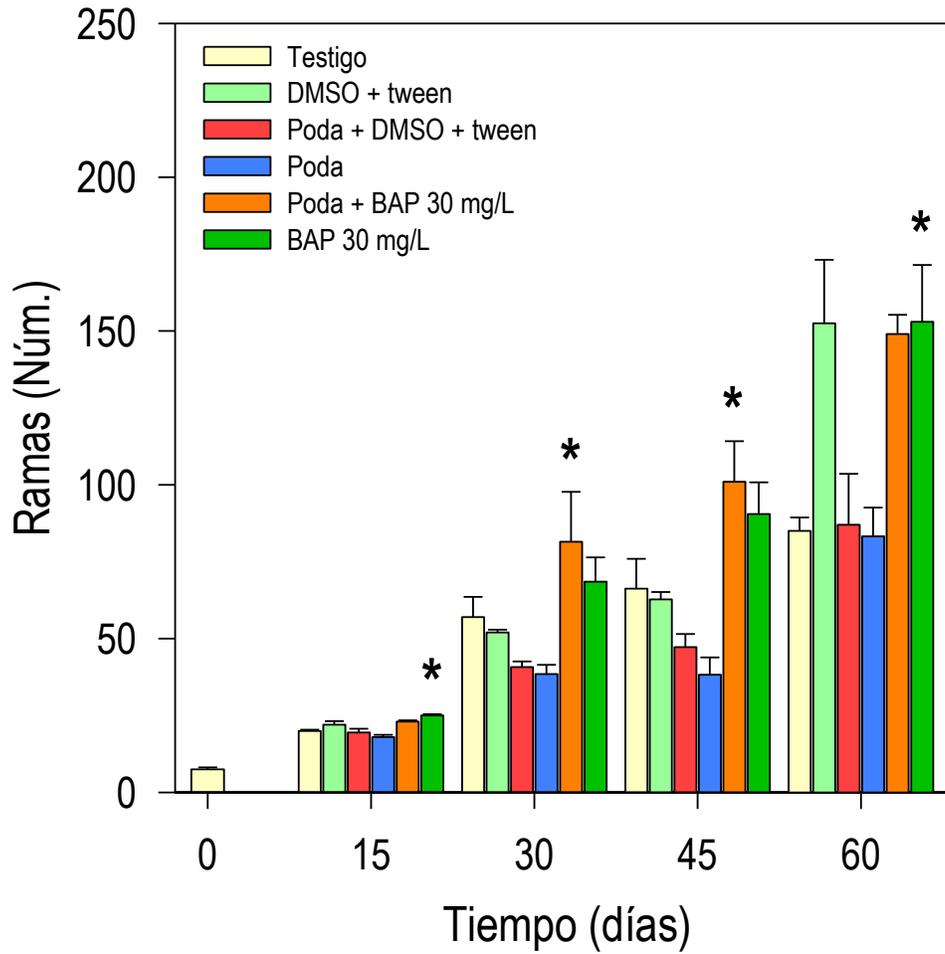
### 3.5.2 Número de hojas

El número de hojas trifolioladas por planta en el testigo incrementó ( $P \leq 0.05$ ) fue de ocho a 800 en 60 días. Entre los otros cinco tratamientos, DMSO + tween, poda + DMSO + tween y poda el número de hojas no cambio significativamente entre los 30 y 45 días; sin embargo, el número de hojas en estos incrementó ( $P \leq 0.05$ ) entre los 45 y 60 días; y en el caso de DMSO + tween y poda el incremento fue más del doble. A los 60 días, entre los tratamientos se observaron dos grupos, en el primero se incluyó la poda y poda + DMSO + tween, con acumulación similar ( $P > 0.05$ ) al testigo; el otro grupo, donde se agruparon los tratamientos DMSO + tween, poda + DMSO + tween y BAP, acumularon en promedio 90 % más hojas comparado con el testigo (Figura 3.3).

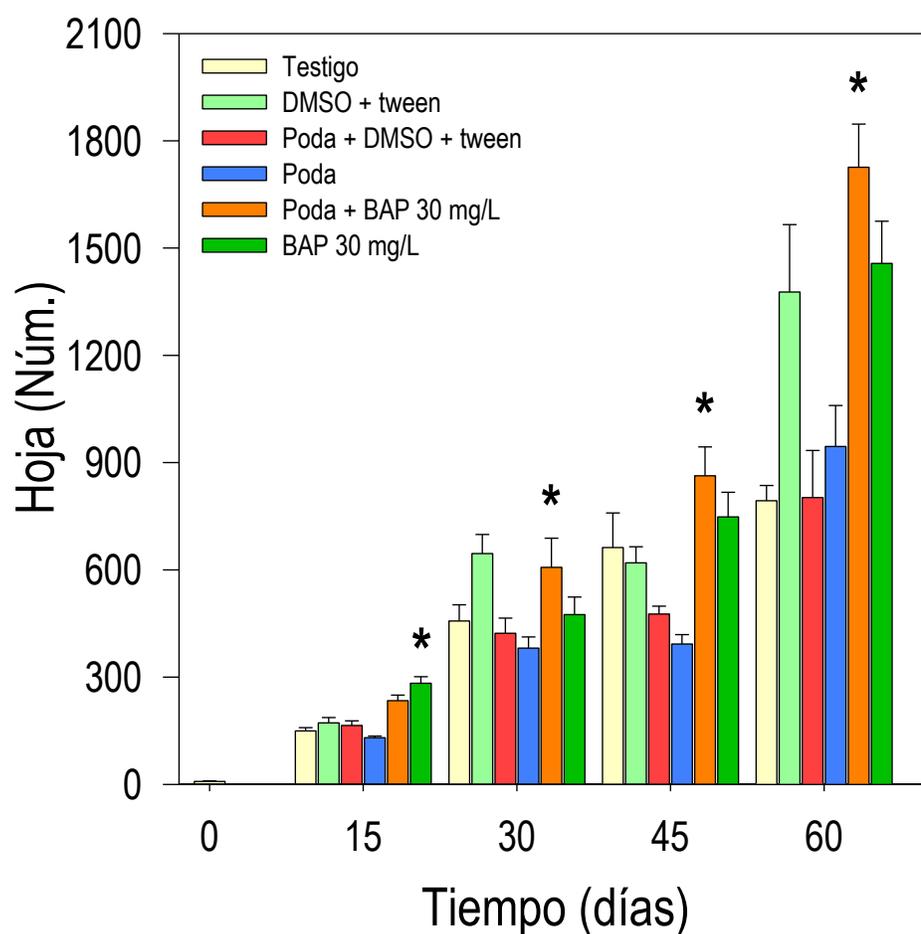
### 3.5.3 Biomasa fresca de folíolos

La biomasa fresca de los folíolos por planta en el testigo, poda apical sin y con (DMSO + tween 20) fue ( $P \leq 0.05$ ) de 9.63 g a casi 100 g en 60 días. Aunque, a los 45 días la biomasa fresca de los folíolos del testigo fue 22 % mayor respecto a la acumulada a los 60 días. En contraste, los otros

tres tratamientos acumularon más biomasa fresca ( $P \leq 0.05$ ) en los folíolos durante los 60 días. Los tratamientos BAP y poda + BAP acumularon 165 g y más de tres veces más biomasa fresca de folíolos respecto al testigo a los 60 días (Figura 3.4).



**Figura 3.2.** Número de ramas + *E.E.* por planta de *Crotalaria longirostrata* durante 60 días de crecimiento en invernadero ( $n = 4$ ), el asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa entre dos o más tratamientos por fecha ( $\alpha = 0.05$ ).

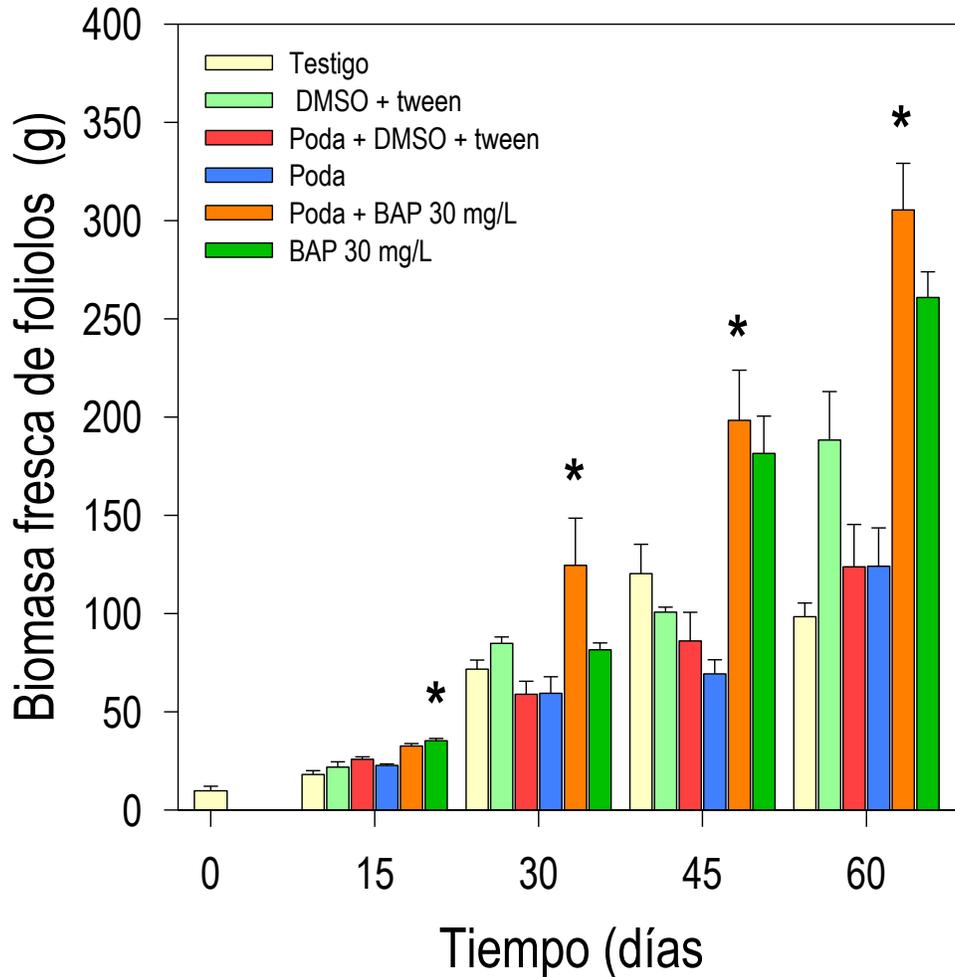


**Figura 3.3.** Número hojas + *E.E.* por planta de *Crotalaria longirostrata* durante 60 días de crecimiento en invernadero ( $n = 4$ ), el asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa entre dos o más tratamientos por fecha ( $\alpha = 0.05$ ).

### 3.5.4 Biomasa fresca de ramas

La biomasa fresca de las ramas por planta en el testigo incrementó ( $P \leq 0.05$ ) de 6.8 g a 110 g en 60 días. En contraste, excepto el tratamiento poda, los otros tratamientos acumularon más biomasa fresca ( $P \leq 0.05$ ) en sus ramas durante los 60 días. En el tratamiento poda la biomasa de las ramas no cambió entre los 30 y 45 días. A los 60 días, los tratamientos formaron dos grupos, el primero de ellos incluyó los tratamientos DMSO + tween, poda y poda + DMSO + tween, con 43 % más biomasa promedio acumulada respecto al testigo. El otro grupo acumuló en promedio cerca del

triple de biomasa fresca en sus ramas respecto al testigo e incluyó los dos tratamientos con BAP (Figura 3.5).

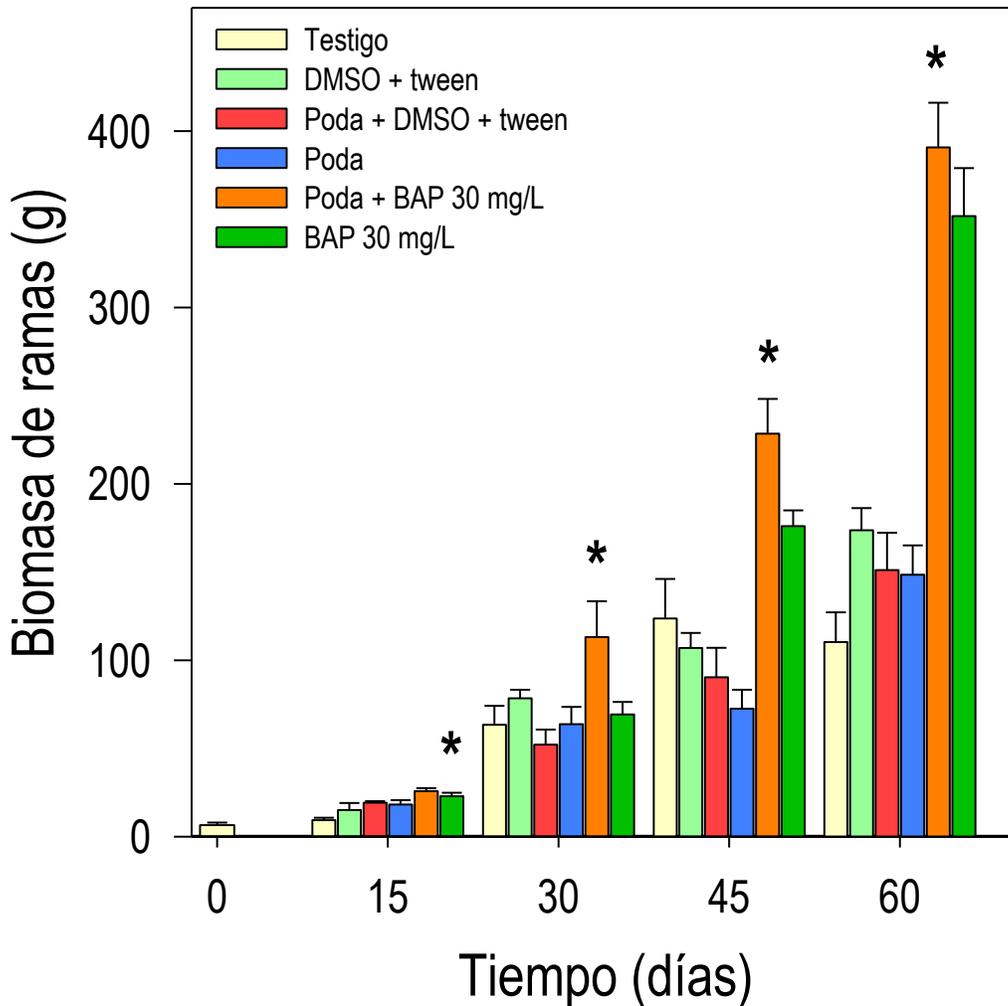


**Figura 3.4.** Biomasa de foliolos + *E.E.* por planta de *Crotalaria longirostrata* durante 60 días de crecimiento en invernadero ( $n = 4$ ), el asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa entre dos o más tratamientos por fecha ( $\alpha = 0.05$ ).

### 3.5.5 Área foliar

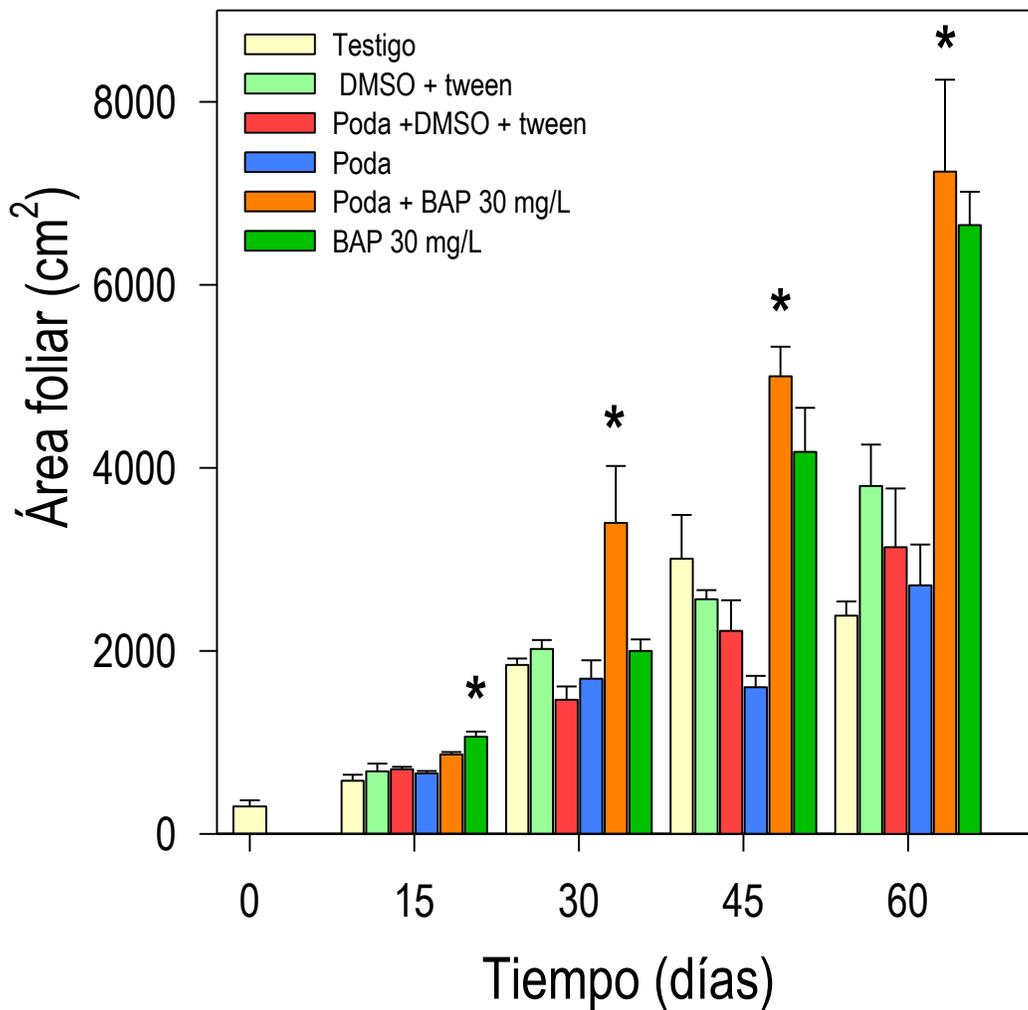
El área foliar por planta en el testigo incrementó ( $P \leq 0.05$ ) de 300 a 2025 cm<sup>2</sup> en 60 días; aunque, la acumulación mayor (3006 cm<sup>2</sup>) se identificó a los 45 días. El tratamiento poda no incrementó

el área foliar entre los 30 y 45 días; además, a los 30 y 45 días hasta tres tratamientos acumularon menos ( $P \leq 0.05$ ) biomasa respecto al testigo.



**Figura 3.5.** Biomasa fresca de ramas + *E.E.* por planta de *Crotalaria longirostrata* durante 60 días de crecimiento en invernadero ( $n = 4$ ), el asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa entre dos o más tratamientos por fecha ( $\alpha = 0.05$ ).

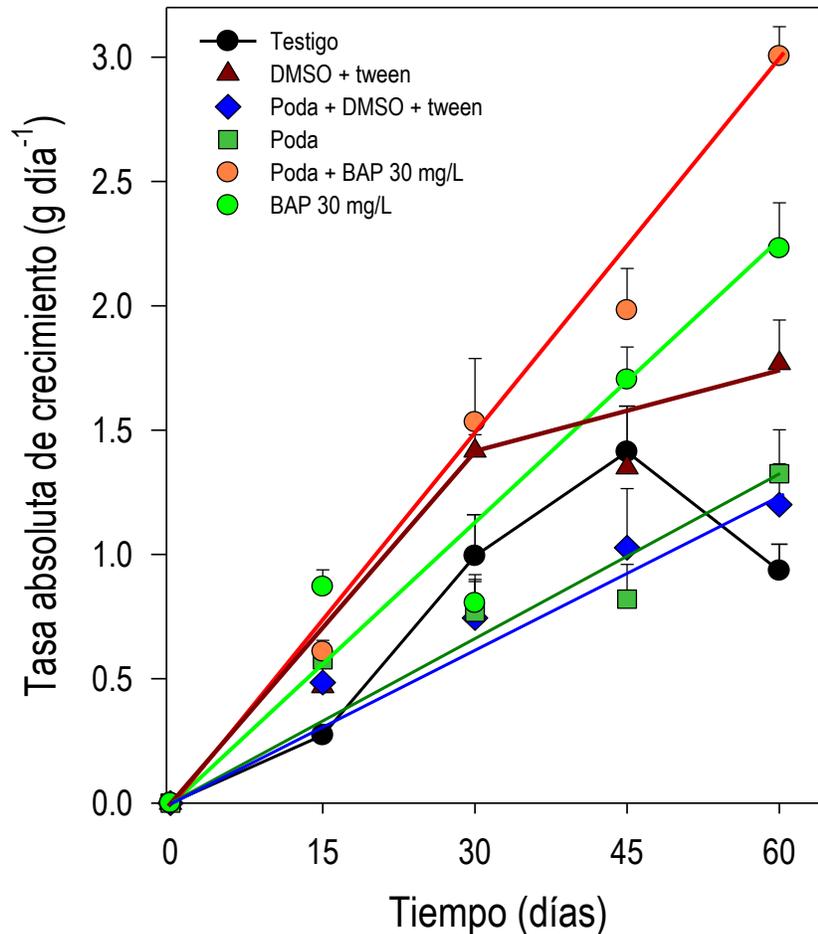
A los 60 días los tratamientos poda y poda + DMSO + tween no difirieron ( $P > 0.05$ ) del testigo, en tanto el área foliar del tratamiento DMSO + tween se incrementó 14 % el área foliar respecto al testigo. Además, los tratamientos BAP y poda + BAP acumularon cerca de tres veces más que el testigo (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Área foliar + *E.E.* por planta de *Crotalaria longirostrata* durante 60 días de crecimiento en invernadero ( $n = 4$ ), el asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa entre dos o más tratamientos por fecha ( $\alpha = 0.05$ ).

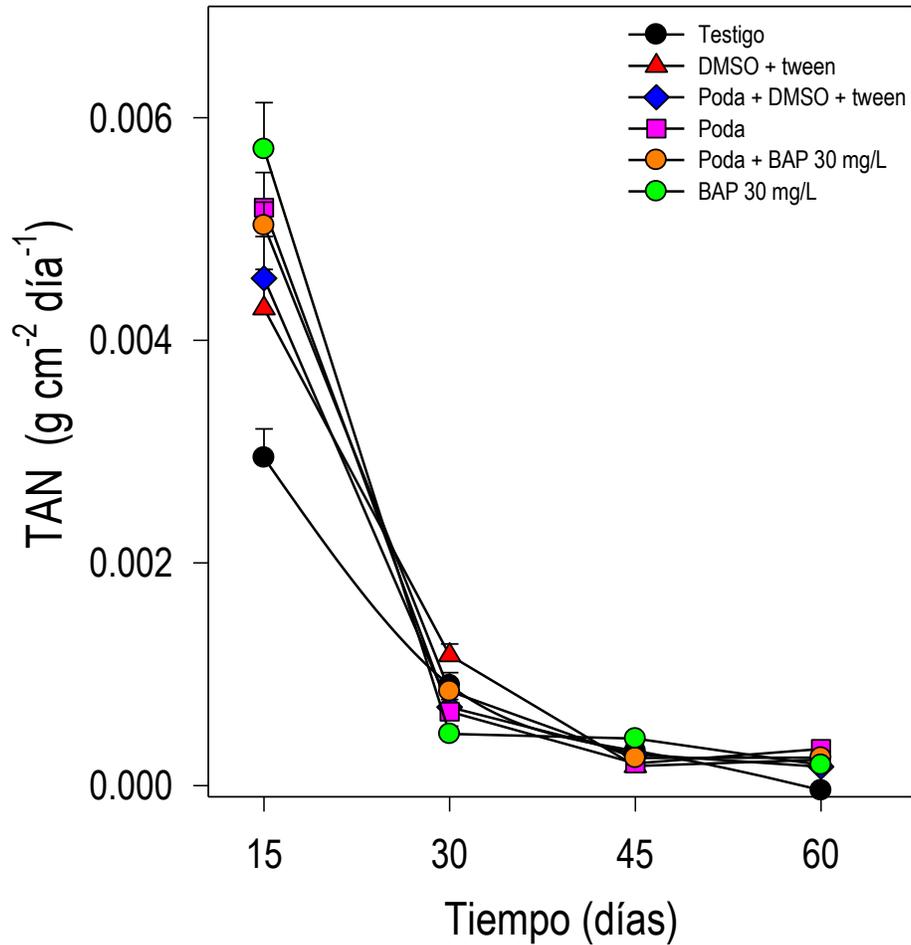
### 3.5.6 Tasa absoluta de crecimiento (TCA)

Con excepción del testigo, los tratamientos acumularon la mayor cantidad de materia seca por día a los 60 días, en el caso del testigo la acumulación mayor se identificó a los 45 días.



**Figura 3.7.** Tasa absoluta de crecimiento + *E.E.* de *Crotalaria longirostrata* durante 60 días de crecimiento en invernadero ( $n = 4$ ) con tratamientos diversos.

Además, a entre los 45-60 días los valores de TCA fueron significativamente diferentes entre los seis tratamientos. En los tratamientos poda + DMSO + tween, poda, BAP y poda + BAP, la TCA incrementó linealmente durante los 60 días. Con la caída de la TCA de los 45 a los 60 días, el control mostró la TCA menor a los 60 días, con valores cercanos a  $1 \text{ g día}^{-1}$ , en el grupo completo de los tratamientos. En el extremo opuesto, estuvo el tratamiento que combinó poda + BAP, con valores de TCA de  $3 \text{ g día}^{-1}$ . Además, el tratamiento BAP mostró el siguiente valor mayor, con  $2.2 \text{ g día}^{-1}$  a los 45-60 días. Los tratamientos que combinaron vehículo y coadyuvante y los dos con poda mostraron valores intermedios (Figura 3.7; Cuadro 3.1).



**Figura 3.8.** Tasa de asimilación neta + *E.E.* de *Crotalaria longirostrata* durante 60 días de crecimiento en invernadero ( $n = 4$ ) con tratamientos diversos.

### 3.5.7 Tasa de asimilación neta

La tasa media de asimilación neta (TAN) de los seis tratamientos se observó a los 15 días, con valores entre  $0.003 \text{ g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ , en el testigo, y  $0.0058 \text{ g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ , en el tratamiento BAP. La TAN disminuyó drásticamente entre los 15 y 30 días en los seis tratamientos, a valores menores a  $0.0011 \text{ g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ . La disminución continuó en la mayoría de los tratamientos a los 45 y 60 días, y únicamente el tratamiento testigo mostró valor cero a los 60 días (Figura 3.8; Cuadro 3.1).

**Cuadro 3.1.** Tasa absoluta de crecimiento del cultivo (TCA) y de asimilación neta (TAN) de plantas de *Crotalaria longirostrata*, en invernadero, en función de la poda y la hormona de crecimiento (BAP).

Tratamiento	TCA (g día <sup>-1</sup> )				TAN (g cm <sup>-2</sup> día <sup>-1</sup> )			
	15	30	45	60	15	30	45	60
..... Tiempo (días) .....								
Testigo	0.3 c	0.9 ab	1.4 abc	0.9 d	3e <sup>-3</sup> b	9e <sup>-4</sup> ab	3.1e <sup>-4</sup> a	4.3e <sup>-5</sup> b
DMSO + tween	0.4 bc	1.4 ab	1.3 abc	1.7 bc	4e <sup>-3</sup> ab	1.2e <sup>-3</sup> ab	1.8e <sup>-4</sup> a	2.3e <sup>-4</sup> ab
Poda+DMSO+tween	0.4 bc	0.7 b	1.0 bc	1.2 cd	4e <sup>-3</sup> ab	7.0e <sup>-4</sup> bc	2.8e <sup>-4</sup> a	1.7e <sup>-4</sup> ab
Poda	0.5 bc	0.7 b	0.8 c	1.3 cd	5e <sup>-3</sup> a	6.6e <sup>-4</sup> bc	2.0e <sup>-4</sup> a	3.3e <sup>-4</sup> a
Poda+BAP	0.6 b	1.5 a	1.9 a	3.0 a	5e <sup>-3</sup> a	8.5e <sup>-4</sup> abc	2.5e <sup>-4</sup> a	2.5e <sup>-4</sup> ab
BAP 30 mg/L	0.8 a	0.8 b	1.7 ab	2.2 b	6e <sup>-3</sup> a	4.6e <sup>-4</sup> c	4.2e <sup>-4</sup> a	1.9e <sup>-4</sup> ab
Tukey $\alpha=0.05$ , DMS	0.302	0.7	0.74	0.70	2e <sup>-3</sup>	4.3 e <sup>-4</sup>	4.3e <sup>-4</sup>	2.9e <sup>-4</sup>
Media general	0.55	1.0	1.4	1.74	5e <sup>-3</sup>	7.9 e <sup>-4</sup>	2.7e <sup>-4</sup>	2.0e <sup>-4</sup>
CV (%)	24.5	30.4	23.8	17.9	15.9	24.1	69.9	68.6

### 3.6 DISCUSIÓN

Un carácter expresado por las plantas es la dominancia apical, la que se define como el control ejercido por el ápice de los brotes activos que actúan como fuente de auxinas; estas hormonas vegetales se movilizan basipetalamente a través de la corriente polar de transporte del sistema vascular del tallo (Spencer *et al.*, 2022). El flujo de auxinas basipétalo bloquea la capacidad de exportación de auxina a los meristemas axilares latentes (Prusinkiewicz *et al.*, 2009; Bishop *et al.*, 2015). Sin embargo, si el transporte de auxina basipetal, se interrumpe, mediante la escisión de los brotes apicales, las yemas axilares pueden exportar auxina y en ellas las citoquininas (trans-zeatina “Z”), procedentes de la raíz, promueven el rebrote de las yemas axilares (Azcón-Bieto y Talón, 2013; Bishop *et al.*, 2015; Barbier *et al.*, 2017; Glanz-Idan *et al.*, 2020); esto permite el crecimiento de las ramas (Prusinkiewicz *et al.*, 2009; Spencer *et al.*, 2022). Los resultados del presente estudio mostraron que la poda apical sumada a la presencia de BAP exógena aumentó hasta 45 % la ramificación respecto al testigo de las plantas de *C. longirostrata* (Chipilín). Este resultado se explica por la pérdida de dominancia apical y por la acción del regulador de crecimiento exógeno, lo que consecuentemente estimuló las yemas vegetativas laterales, que hasta entonces se encontraban latentes. Este resultado coincidió con lo documentado en los estudios de Barbier *et al.* (2019), Müller y Leyser (2011), Ongaro y Leyser (2008) y Wu *et al.* (2021), en los que las citoquininas promovieron la ramificación lateral en las plantas. El incremento del número de ramas se acompañó con el aumento significativo del número de hojas (52 %), biomasa fresca de folíolos (68 %), ramas (64 %) y área foliar (67 %) respecto al grupo de los testigos. Los resultados de este estudio coincidieron parcialmente con los de Sosnowski *et al.* (2019) en plantas de alfalfa (*Medicago x varia* T. Martyn) asperjadas con BAP (30 mg/L), que incrementaron 21 % el número de hojas, aunque de tamaño menor. En las plantas de *C. longirostrata*, las hojas aumentaron en

tamaño y grosor. Estos cambios, *i.e.*, aumento del área foliar, se deben al alargamiento y multiplicación celular (Sosnowski *et al.*, 2019; Wadas y Dziugieł, 2020). El efecto similar se demostró en plantas de *Epipremnum aureum* L. con BAP (5 mg/L) exógena; en esas plantas el aumento de hasta 45 % del área foliar y de la biomasa fresca, mostró su asociación con la producción foliar acelerada (Benedetto *et al.*, 2013, 2015). El incremento de la biomasa vegetativa se asocia con tasas de asimilación neta y tasa absoluta de crecimiento mayores; además, con el crecimiento mayor de las plantas tratadas por el efecto de la poda apical, la aplicación de BAP exógena incrementará. En el tratamiento testigo, la disminución del TAN resultante del crecimiento de las plantas de chipilín es atribuible al incremento de su follaje, durante los 15 y 30 días; el crecimiento y desarrollo de las hojas trifolioladas disminuyó a los 60 días, cuando estaban iniciando la etapa reproductiva, evidenciada por la formación de botones florales. A partir de esta etapa, la senescencia foliar inició; este efecto fue documentado por Escalante *et al.* (2015) en plantas de maíz asociado con frijol ayocote.

La poda del meristemo apical incrementa los niveles de citoquininas, elimina la dominancia apical y promueve el crecimiento de las yemas laterales (Azcón-Bieto y Talón, 2013; Bishop *et al.*, 2015). En este estudio, la poda apical no afectó significativamente el número de ramas; sin embargo, sí incrementó el número de hojas, su biomasa y el área foliar respecto al testigo. El incremento de los componentes del rendimiento relacionados con el follaje puede mejorar los efectos causados por la aplicación exógena de BAP. En concordancia con lo anterior, la eliminación del 10 % de los brotes apicales en plantas de *Amaranthus cruentus* L. incrementó longitud de ramas primarias y el número de ramas secundarias mientras que la biomasa del tallo se incrementó al doble (Martínez-Moreno *et al.*, 1999).

El DMSO es un compuesto orgánico utilizado frecuentemente como disolvente. Este disolvente activó el metabolismo de las plantas de *C. longirostrata* ya que promovió hasta 40 % el número y biomasa de ramas, número de hojas y área foliar respecto al testigo. Aunque, estos efectos fueron evidentes únicamente después de tres aplicaciones del disolvente (cada 15 días), cuando las plantas tenían 60 días de edad. La actividad del DMSO en los sistemas biológicos fue documentado por Gutiérrez *et al.* (2003), quienes lo describieron como transportador sistémico de sustancias químicas en tejidos vegetales y animales y que mejora la penetración de sustancias en los tejidos vegetales; también, este compuesto se ha utilizado para disolver reguladores de crecimiento, herbicidas y pesticidas (Maure *et al.*, 1969). El efecto del DMSO como regulador de crecimiento fue propuesto como resultado de las investigaciones que demostraron su efecto en el aumento de enraizamiento, biomasa y longitud de raíz (28 y 10 %, respectivamente), la inducción a la floración y el control del tamaño de la planta mediante aspersiones foliares (San Miguel *et al.*, 2003).

Los resultados de este estudio coinciden con los documentados por Cruz-Campos *et al.* (2012); estos autores observaron que las plantas de chile (*Capsicum chinense* Jacq) asperjadas con DMSO incrementaron 17 % en el número de ramas primarias, altura y follaje. Así mismo, Gutiérrez-Rodríguez *et al.* (2003) demostraron el incremento del crecimiento en la longitud de la raíz y la biomasa fresca de tubérculo de remolacha (*Beta vulgaris* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.) y rábano (*Raphanus sativus* L.) al aplicar DMSO a los cultivos. La investigación de los efectos del DMSO en las plantas de *C. longirostrata* y otras especies debe continuar para avanzar en el conocimiento de su modo de acción y la concentración adecuada para estimular el crecimiento y rendimiento.

En este estudio se demostró que la BAP exógena extendió la fase vegetativa y, consecuentemente, atraso la senescencia foliar de *C. longirostrata*. Al respecto, BAP aplicada exógenamente disminuye la senescencia, desacelera la degradación de los pigmentos fotosintéticos asociada a la senescencia y el deterioro de la función fotosintética, ya que frena la degradación de la clorofila y retrasa la senescencia (Janečková *et al.*, 2019; Sosnowski *et al.*, 2019; Cho *et al.*, 2022).

En general, la combinación de poda y BAP (con concentración de 30 mg/L) solubilizada con DMSO es recomendable para obtener las formas comerciales óptimas de Chipilín, después de 45 y 60 días de cultivo; esto es, debido a que la venta de esta planta en los mercados incluye las hojas y ramas tiernas. Estudios posteriores podrán incluir evaluaciones de las dosis menores y mayores de BAP para aumentar aún más la producción de biomasa del follaje.

Este estudio también demostró que el cultivo de plantas de Chipilín y la producción de follaje suficiente por planta es posible en invernadero. Sin embargo, la investigación podrá continuarse para evaluar; entre las formas de cultivo deberá incluirse el cultivo en los terrenos de los campesinos-productores, ya que, en general, los agricultores no tienen acceso a un invernadero.

### 3.7 CONCLUSIONES

La producción de follaje de *C. longirostrata* es posible mediante el cultivo en invernadero y puede triplicarse con BAP exógena y la combinación con poda temprana del tallo se favorece aún más esa producción.

El DMSO estimula la formación de ramas y hojas, además la producción de biomasa en plantas de *C. longirostrata*.

**CAPÍTULO IV. CONTRASTE EN EL CONTENIDO DE METABOLITOS PRIMARIOS  
Y DEL METABOLISMO ESPECIALIZADO EN PLANTAS DE *Crotalaria longirostrata*  
Hook. & Arn. RECOLECTADAS *in situ* Y CULTIVADA EN INVERNADERO**

**4.1 RESUMEN**

El chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.) se distribuye en regiones tropicales y subtropicales de México; el aprovechamiento de sus brotes, hojas tiernas y flores, desde tiempos prehispánicos, como alimento y en herbolaria es principalmente de poblaciones silvestres, y eventualmente de cultivo. El objetivo fue evaluar la composición química de folíolos, flores y ramas recolectados de poblaciones silvestres en Las Vigas, Ometepec, Guerrero, México (16° 40' 264" N, 98° 27' 502" O y 264 m s.n.m.) y de plantas cultivadas en invernadero en Montecillo, Texcoco, Estado de México (19° 29' N, 98° 53' O, 2,240 m s.n.m). En las muestras de esas estructuras (secadas a 45 °C en estufa y pulverizadas) se cuantificó la concentración de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón con un método enzimático-colorimétrico, cenizas, y proteína total con métodos cuantitativos estándares. Algunos productos del metabolismo especializado se identificaron con métodos cualitativos y cuantitativos. La concentración de glucosa (32 %) y fructosa (11 %) en los folíolos y el de sacarosa de las flores (8 %) de las plantas de invernadero fue significativamente mayor respecto a las recolectadas *in situ*. Similarmente, la concentración de cenizas, fenoles, flavonoides y saponinas fue mayor (29, 15, 47 y 59 %) en los tejidos de plantas en invernadero. En contraste, la concentración de proteína (15 %), fibra detergente neutro (14 %), hemicelulosas (21 %), taninos (60 %) y terpenos (46 %) de folíolos y flores recolectados *in situ* fue mayor respecto a los de invernadero. La composición química de los folíolos y las flores de las plantas de Chipilín se modifica con el ambiente de crecimiento.

**Palabras clave:** azúcares, Chipilín, fenoles, fibra alimentaria, flavonoides, proteína, saponinas

## 4.2 ABSTRACT

The “chipilín” (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.) is distributed in tropical and subtropical regions of Mexico; the use of its young leaflets and flowers as food and in herbalism since pre-Hispanic times is mainly from wild populations, and to a lesser extent from crops. The objective was to evaluate the chemical composition of leaflets, flowers and branches collected from wild populations in Las Vigas, Ometepe, Guerrero, Mexico (16° 40' 264” N, 98° 27' 502” W and 264 m a.s.l.) and from plants grown in greenhouses in Montecillo, Texcoco, Estado de México (19° 29' N, 98° 53' W, 2,240 m a.s.l.). In the samples of these structures (dried at 45 °C in an oven and powdered) the concentration of ashes, total protein, and fiber was quantified with standard quantitative methods; glucose, fructose, sucrose and starch were quantified with an enzymatic-colorimetric method; and some products of the specialized metabolism were identified-quantified with qualitative and quantitative methods. The concentration of glucose (32 %) and fructose (11 %) in the leaflets and that of sucrose in the flowers (8 %) of the greenhouse plants was significantly higher than those collected *in situ*. Similarly, the concentration of ash, phenols, flavonoids and saponins was (29, 15, 47 and 59 %) higher in the tissues of greenhouse plants. In contrast, the concentration of protein (15 %), neutral detergent fiber (14 %), hemicelluloses (21 %), tannins (60 %) and terpenes (46 %) of leaflets and flowers collected *in situ* was higher compared to those of the greenhouse. The chemical composition of the leaflets and flowers of Chipilín plants is modified by the growth environment.

**Keywords:** Chipilín, dietary fiber, flavonoids, phenols, protein, saponins, sugars.

### 4.3 INTRODUCCIÓN

Los metabolitos primarios se califican como esenciales para el crecimiento y desarrollo fundamental de las plantas, en cambio, existe otro grupo de reacciones metabólicas y productos de las vías biológicas que se identifican como metabolismo y metabolitos especializados (Colinas y Fitzpatrick, 2022). El metabolismo especializado ha evolucionado en las plantas debido a la presión selectiva favorecida por la adaptación a ambientes particulares, por lo que son relevantes para las interacciones entre las plantas y el ambiente (Weng *et al.*, 2021). Los límites bioquímicos precisos entre el metabolismo primario y el especializado son imprecisos. Los metabolitos especializados son multifuncionales y pueden actuar como reguladores del crecimiento, alimentar al metabolismo primario y mediar en las interacciones planta-ambiente (Erb y Kliebenstein, 2020). Además, se ha reconocido una interfaz entre el metabolismo primario y el especializado (Colinas y Fitzpatrick, 2022), por lo que conviene ver a los metabolitos primarios y especializados como redes metabólicas completas integradas y formadas por la selección ambiental (Erb y Kliebenstein, 2020). La biosíntesis, distribución y movilización de los metabolitos difiere entre las estructuras de la planta (Kumar *et al.*, 2017). Además, los elementos inorgánicos como Fe, Mg, Ca y otros son relevantes en ambos grupos de reacciones metabólicas, ya que son algunos de los cofactores enzimáticos del metabolismo (Colinas y Fitzpatrick, 2022). Independientemente de la clasificación de los metabolitos producidos en las plantas, el interés en su presencia y concentración en las plantas comestibles es central en la alimentación de los humanos por sus repercusiones en el metabolismo (Essiett *et al.*, 2010). La presencia, o ausencia, y la concentración de los compuestos químicos de ambos tipos de metabolismo están relacionados con la calidad alimenticia, el sabor, olor y consistencia de las estructuras de la planta, y varían con la etapa fenológica, el ambiente de crecimiento, su manejo y lugar de origen (Jiménez-Aguilar y Grusak, 2015; Kumar *et al.*, 2017;

Erb y Kliebenstein, 2020). Paralelamente, los metabolitos especializados son fuente de medicamentos, antibióticos, antifúngicos, cosméticos, perfumes y saborizantes (Erb y Kliebenstein, 2020; Colinas y Fitzpatrick, 2022).

El género *Crotalaria* L. incluye entre 600 y 700 especies, su distribución incluye regiones tropicales y subtropicales del mundo (Polhill, 1982; Bernal 1986). Quinientas de esas especies son nativas de África y Madagascar y 79 son nativas de América. En México se localizan 21 especies y ocho se han reconocido como endémicas (Soto-Estrada, 2004), distribuidas en la región suroeste, entre 200 y 2600 m sobre el nivel del mar. De ellas se ha identificado a *C. longirostrata* Hook. & Arn, *C. pumila* Ortega y *C. incana* L. con importancia agrícola (Basurto-Peña, 2011), aunque son especies silvestres y, frecuentemente, arvenses; Recientemente se ha incorporado a *C. juncea* L., como una especie forrajera alternativa y como abono para el suelo (Almeida-Santos *et al.*, 2019; Gámez *et al.*, 2019; Magaña-Valenzuela *et al.*, 2020).

Las plantas de *C. longirostrata* son herbáceas que pueden crecer hasta 2 m de alto, sus hojas son trifolioladas; los folíolos son elípticos a obovados y sus inflorescencias en forma de racimos, en el ápice del tallo, presentan entre 10 y 30 flores amarillas, con manchas rojas (Soto-Estrada, 2004; Rzedowski *et al.*, 2016;). Esta especie recibe el nombre común de Chipilín o Chipile en Oaxaca, Guerrero, Tabasco y Chiapas (Basurto-Peña, 2011; Castro-Lara *et al.*, 2014) y es la única registrada como comestible por las poblaciones étnicas, campesinas y ciudadanas de Mesoamérica en época prehispánica y, actualmente, en México y Centroamérica (Arias *et al.*, 2003; FAO, 2018). Debido a la cantidad de migrantes mexicanos y centroamericanos en EE.UU., la demanda de este producto está incrementando en años recientes (Mangan *et al.*, 2010; Camarillo-Castillo y Mangan, 2020;). En México el consumo incluye los folíolos jóvenes y las flores en la alimentación y la herbolaria, principalmente de poblaciones silvestres durante la temporada de lluvia y, en

proporción menor, de cultivos de traspatio (Basurto-Peña, 2011; Castro-Lara *et al.*, 2014; FAO, 2018). La composición química del follaje de *C. longirostrata* se ha documentado parcialmente, incluyendo macro y micronutrientes como vitaminas (A, B1, B2,  $\beta$ -carotenos y ácido ascórbico), minerales (2 a 9 %), fibra cruda (3 a 8 %) aminoácidos como arginina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, treonina y valina (1.76 a 6.7 %), proteína cruda (7 a 38 %), carbohidratos (7 a 9 %) y compuestos funcionales como fenoles, flavonoides, saponinas, entre otros (0.02 a 0.4 %) en cantidades suficientes para satisfacer los requerimientos individuales diarios (Ranhotra *et al.*, 1998; Arias *et al.*, 2003; Ek-Chulim *et al.*, 2018; Mateos-Maces *et al.*, 2020). Las actividades fungicida, antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes de *C. longirostrata* se ha comprobado y adjudicado a la presencia de productos del metabolismo especializado como fenoles, flavonoides, saponinas, cumarinas, taninos, antraquinonas, antronas y alcaloides (Bibi *et al.*, 2015; Miranda-Granados *et al.*, 2018; Cruz-Rodríguez *et al.*, 2020).

Debido al incremento del consumo de Chípil se ha reconocido la posibilidad de su cultivo en invernadero; sin embargo, se desconoce si el cultivo de las plantas modifica o no la composición de las estructuras comestibles, *i.e.*, folíolos y flores, y las ramas como estructuras fuente de metabolitos especializados.

El objetivo de este estudio fue comparar la composición química de los folíolos, las flores y las ramas de plantas de *C. longirostrata* recolectadas *in situ*, en Guerrero, México, con la de las estructuras de plantas cultivadas en invernadero, en Montecillo, Estado de México. La hipótesis fue que la composición química de los tejidos de las plantas de *C. longirostrata* no se modifica significativamente con los ambientes de crecimiento y que su valor alimenticio como fuente de metabolitos primarios y del metabolismo especializado se mantiene con el cultivo.

## 4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

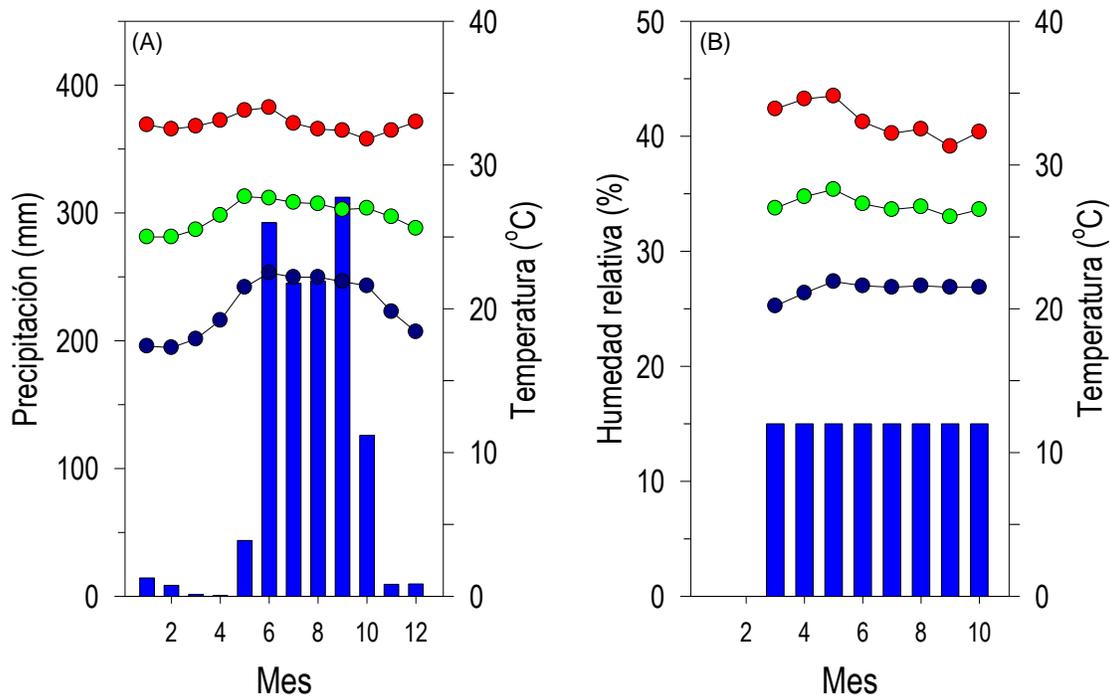
### 4.4.1 Material vegetal

Se recolectaron los folíolos, las flores y las ramas de *C. longirostrata* de poblaciones silvestres, de la localidad Las Vigas, Ometepec, Guerrero, México (16° 40' 264" N, 98° 27' 502" O y 264 m s. n. m.; CONAGUA, 2021) en noviembre de 2020. Las áreas circundantes a los rodales muestreados tienen manejo agrícola y ganadero. El clima es cálido subhúmedo, con lluvias y canícula en verano ( $Aw_2(w)$ ), con 1100 mm y 25 - 28 °C de precipitación y temperatura media anual, respectivamente (Figura 4.1 A) (García, 2004; CONAGUA, 2021). La vegetación aledaña del sitio de recolecta incluye árboles de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp. (Salinas *et al.*, 2022). La identidad taxonómica de las plantas muestreadas se confirmó con ejemplares recolectados ex profeso, herborizados y registrados en el Herbario-Hortorio CHAPA, del Colegio de Postgraduados (accesión Núm. 155775).

Además de las muestras recolectadas *in situ*, para su análisis se cosecharon las mismas estructuras de plantas cultivadas en un invernadero del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México (19° 29' N, 98° 53' O y 2240 m s. n. m). Estas se obtuvieron de semillas de frutos (legumbres) de *C. longirostrata* que se recolectaron en febrero del 2019 de rodales en la misma localidad Las Vigas, Ometepec, Guerrero y. Las plantas en invernadero se cultivaron entre febrero y agosto de 2020. En tres semilleros con 200 cavidades se sembraron dos semillas por cavidad, de ahí se obtuvieron 100 plantas cada una se trasplantó en macetas con 10 kg de suelo agrícola. Las plantas se regaron cada tercer día a capacidad de campo, durante 6 meses (a partir de abril de 2020). Después de cuatro meses se cosecharon los folíolos y las ramas y meses después se cosecharon las flores. La temperatura y humedad relativa en el

invernadero se registró a través de un sistema automatizado recolector de datos (data logger) (Figura 4.1 B). Ambos grupos de muestras se deshidrataron a 45 °C hasta peso constante en estufa con aire circulante (BLUE M Island, Illinois U.S.A.); luego, se trituraron en un molino pulverizador eléctrico (Hamilton Beach®, 80350R) y se mantuvieron en bolsas plásticas hasta su análisis.

El análisis de las estructuras vegetales incluyó: contenido de materia seca y concentración de cenizas, proteína total, fibra detergente neutro, hemicelulosa, glucosa, fructosa, sacarosa, almidón, fenoles, flavonoides, taninos, terpenos y saponinas.



**Figura 4.1.** Precipitación media y humedad a capacidad de campo (barras azules), temperaturas promedio mínima (círculos azules), media (círculos verdes) y máxima (círculos rojos) mensual en (A) Las Vigas, Ometepec, Guerrero, México, y (B) en el invernadero en Montecillos, Texcoco, Estado de México, durante el ciclo de crecimiento de plantas de *C. longirostrata*. 1: enero, ..., 12: diciembre.

## **4.4.2 Análisis del material vegetal**

### **4.4.2.1 Cuantificación de materia seca, minerales (cenizas) y metabolitos primarios**

El contenido de materia seca y la concentración de cenizas y proteína cruda se determinaron con los métodos descritos por la Asociación Oficial de Análisis Químicos (AOAC, 2005). El porcentaje de fibra detergente neutro, fibra detergente ácido y hemicelulosa se determinaron con los métodos descritos por Van Soest *et al.* (1991).

La concentración de los azúcares solubles y almidón se determinó utilizando 50 mg de tejido seco y triturado que se mezclaron con 1000  $\mu$ L de etanol al 80 % en agua (v/v), se mantuvo a 80 °C durante 60 min y se centrifugó a 10 000  $\times$  g durante 10 min, un total de tres extracciones. Los sobrenadantes se mezclaron y la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa se cuantificaron con el método enzimático-colorimétrico descrito por Bernal *et al.* (2005). En el sedimento insoluble se cuantificó el almidón con el método enzimático descrito por Boehlein *et al.* (2018).

### **4.4.2.2 Identificación cualitativa y cuantificación de productos del metabolismo especializado**

La identificación cualitativa de productos del metabolismo especializado se hizo en extractos de 0.2 g de cada tejido con 1 mL de metanol. La extracción se hizo en un baño ultrasónico (AutoScienceAS5150B), durante 20 min, con un descanso intermedio de 5 min, después de centrifugar a 5 000  $\times$  g. Los extractos se filtraron y almacenaron en viales de vidrio a 4 °C para su análisis inicial. Este consistió en un “cribado fitoquímico”, que permitió identificar, mediante agentes cromógenos (sustancias que reaccionan formando precipitados y cambio de color), la presencia de alcaloides, fenoles, flavonoides, saponinas, taninos o terpenoides (Soto-Hernández *et al.*, 2019). La presencia o ausencia de los grupos de estos compuestos en cada una de las muestras

se confirmó mediante cromatografía en capa fina de acuerdo con lo descrito por Soto-Hernández *et al.* (2019).

Con base en los resultados de este análisis, se cuantificó la concentración de fenoles, flavonoides, saponinas, taninos y terpenoides mediante los métodos descritos por Hiai *et al.* (1976), Porter *et al.* (1986), Waterman y Mole (1994), Chang *et al.* (2002), Fan y He (2006) respectivamente, modificados por Soto-Hernández *et al.* (2019). Para cada grupo de compuestos se preparó la curva de calibración respectiva, con ácido gálico, quercetina, saponina de quillaja y ácido oleanólico. Los resultados se expresaron en g/100 g de materia seca.

#### **4.4.3. Análisis de suelo**

Muestras de 1 kg de suelo, de la superficie a 40 cm de profundidad, del sitio de recolecta se obtuvieron de acuerdo con lo descrito en NOM.021-RECNAT-2002 (SEMARNAT, 2002). Además, también se separaron muestras del suelo en el que crecieron las plantas en el invernadero para analizarlo. El suelo se clasificó con los criterios de la WRB (IUSS Working Group WRB, 2015). El análisis de las muestras de suelo incluyó: color (carta de colores Munsell), densidad (probeta), retención de humedad (olla de presión), conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico, pH, bases intercambiables (acetato de amonio), materia orgánica (Walkley-Black) y nitrógeno total (micro-Kjeldahl), P soluble (Olsen y Dean, 1965) de acuerdo con lo descrito por van Reeuwijk (2002).

#### **4.4.4. Diseño experimental y análisis estadístico**

El diseño experimental fue completamente al azar con dos tratamientos, estructuras de plantas *in situ* y de plantas cultivadas en invernadero, cada tipo de estructura vegetal y la localidad fue la fuente de variación. La unidad experimental fue una planta y se analizaron cinco repeticiones de

cada estructura vegetal. Los datos de cada tipo de tejido se analizaron mediante la prueba  $t$ -Student con el software SigmaPlot 11.0 (versión libre: <https://sigmaplot.software.informer.com/11.0/>). Además, se obtuvieron los correlogramas o matriz de correlación, basados en los coeficientes de correlación  $\rho$  ( $r_s$ ) de Spearman, método de análisis que no exigen la suposición de la normalidad de los datos (Wackerly *et al.*, 2010). Este análisis incluyó a los metabolitos de folíolos, flores y ramas con el procesador de datos RStudio (R Core Team, 2020) y se usó el paquete ggplot2 versión 3.3.2 (Wickham, 2016) para obtener las figuras.

## 4.5 RESULTADOS

### 4.5.1 Foliolos

La diferencia en la biomasa seca acumulada en los foliolos no fue significativa ( $P > 0.05$ ) entre las condiciones de crecimiento. En contraste, *in situ* los foliolos acumularon 29 % menos minerales ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 4.1).

Las diferencias en la concentración de proteína total, fructosa y sacarosa de los foliolos fueron significativas entre las condiciones de crecimiento; en contraste, la diferencia en la concentración de glucosa no fue significativa. Al respecto, los foliolos que crecieron *in situ* fueron 41 % más ricos en proteína total y 33 % en sacarosa, pero contenían 12 % menos fructosa respecto a los de las plantas del invernadero (Figura 4.2 A-D).

**Cuadro 4.1.** Contenido de biomasa seca y concentración de minerales (g/100 g  $\pm$  E.E.) de foliolos y flores cosechados de plantas *C. longirostrata* en Las Vigas, Ometepe, Guerrero, México, y de plantas cultivadas en invernadero en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Variable	Foliolos		Flores	
	<i>In situ</i>	Invernadero	<i>In situ</i>	Invernadero
BS	95.80 $\pm$ 0.063	95.71 $\pm$ 0.018 (N.D)	96.35 $\pm$ 0.008 *	92.11 $\pm$ 0.05
CZ	6.58 $\pm$ 0.010 *	9.28 $\pm$ 0.015	5.82 $\pm$ 0.005 *	10.84 $\pm$ 0.008

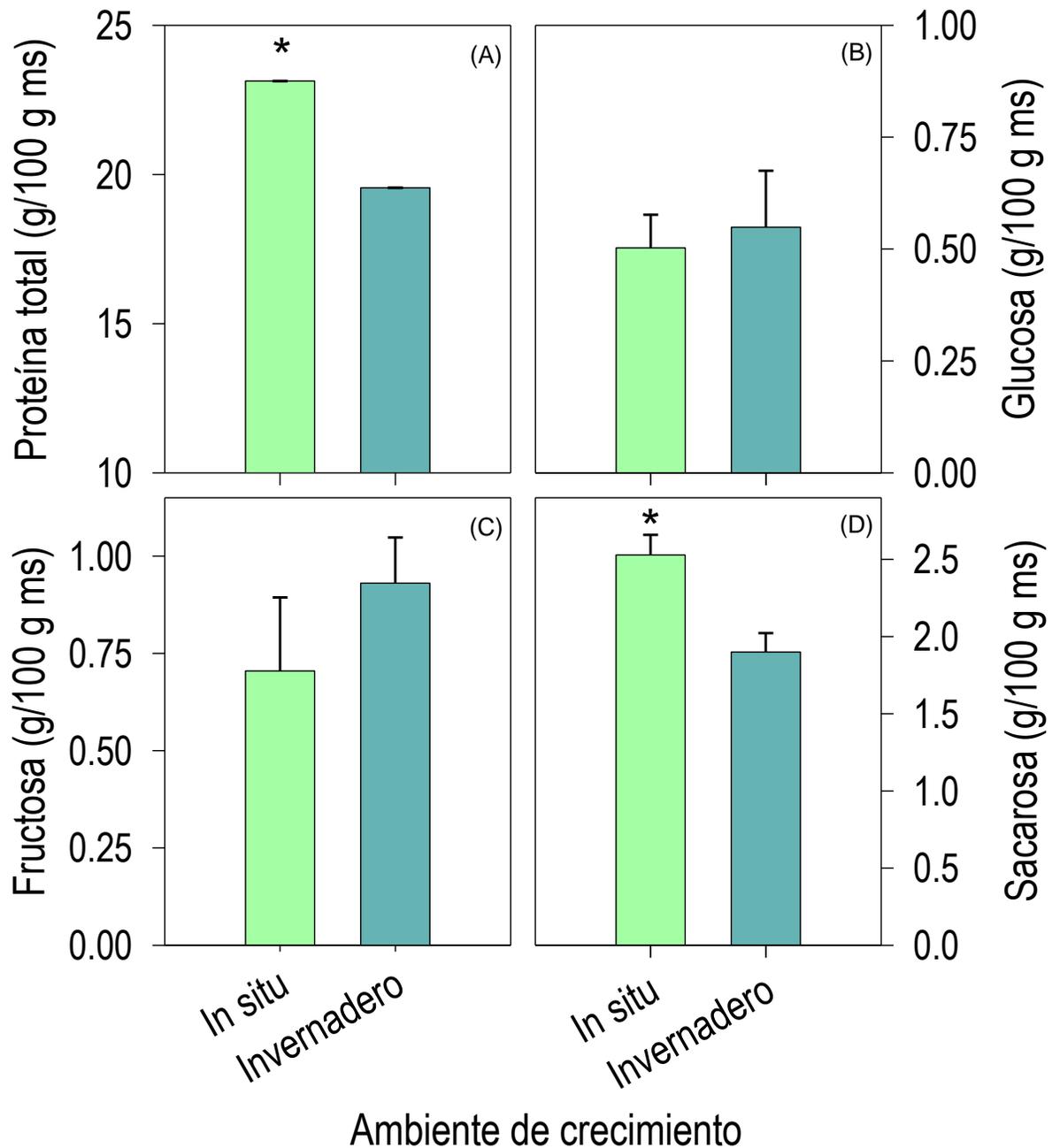
Valores seguidos de un asterisco indican diferencias significativas en foliolos o flores entre las condiciones de crecimiento ( $P \leq 0.05$ ) según la prueba *t*-Student. BS = biomasa seca; CZ = minerales; N.D = no hay diferencias significativas.

En el caso de los polisacáridos, las diferencias en la concentración de almidón y de los polisacáridos de la fibra extraída con detergente ácido no fueron significativas entre los foliolos de ambos orígenes; en contraste, los foliolos de las plantas *in situ* contenían 28 y 15 % más hemicelulosa y fibra extraída con detergente neutro comparados con los cosechados en el invernadero (Figura 4.3 A-D).

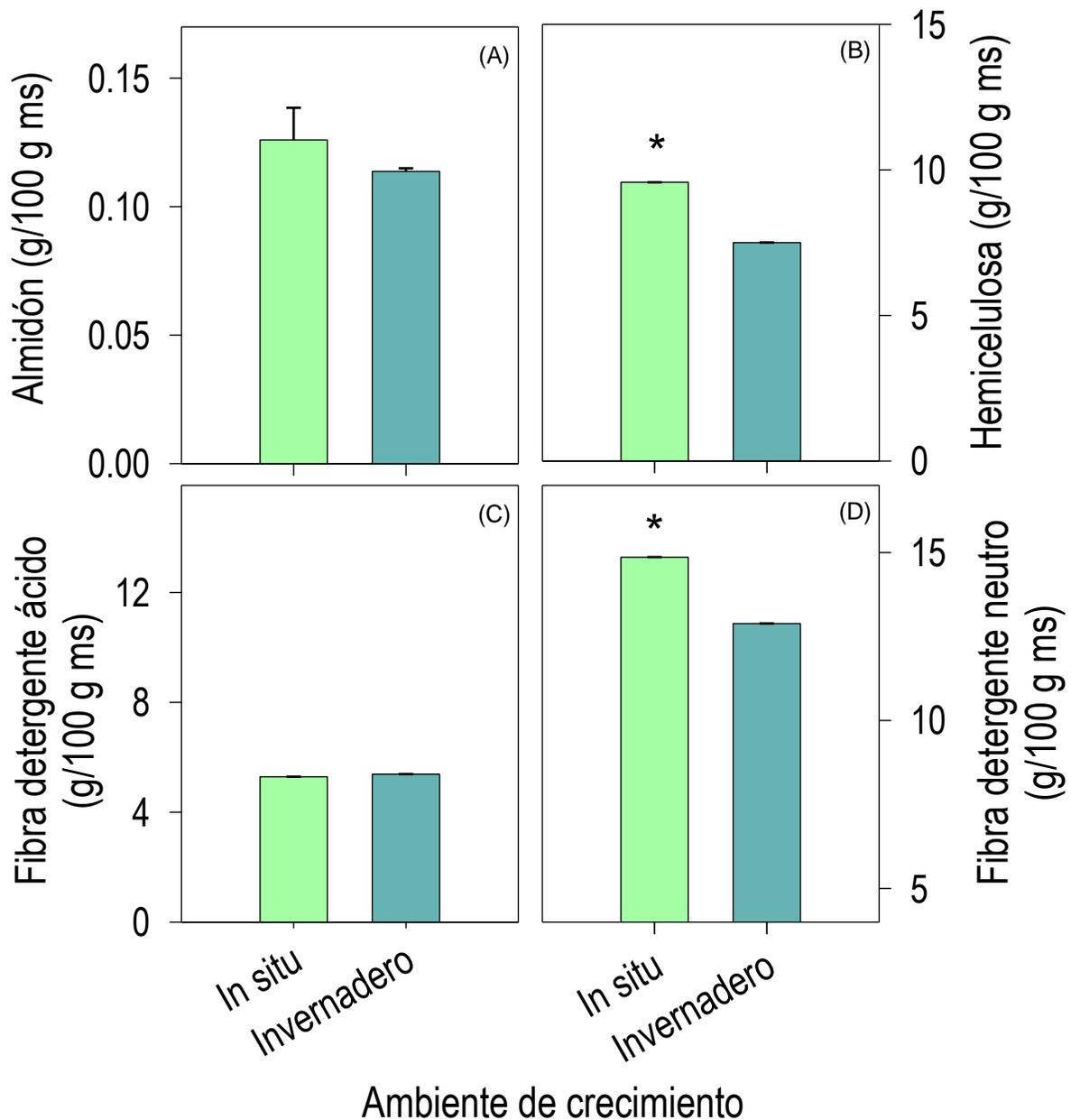
El análisis cualitativo de los grupos químicos del metabolismo especializado mostró abundancia relativa alta de alcaloides, fenoles, saponinas y terpenos y abundancia relativa moderada y escasa de taninos y flavonoides en los folíolos cosechados *in situ*. Ese análisis mostró las siguientes coincidencias entre los folíolos *in situ* y los cosechados en el invernadero; los fenoles y las saponinas mostraron abundancia relativa alta en estos folíolos. Al contrario, en los folíolos de las plantas del invernadero los terpenos y alcaloides se detectaron sólo con abundancia relativa moderada y escasa. Además, los grupos de flavonoides y taninos se encontraron en los folíolos del invernadero en concentraciones relativas moderadas (Cuadro 4.2).

El análisis cualitativo de esos seis grupos químicos del metabolismo especializado permitió confirmar su presencia en los folíolos, aunque su abundancia relativa no concordó con las determinaciones cuantitativas.

Al respecto, los folíolos de las plantas *in situ* acumularon 15 % menos fenoles ( $P \leq 0.05$ ) y cerca de la mitad de flavonoides comparados con los de las plantas de invernadero (Figura 4.4 A-B); en contraste, esos fueron significativamente más ricos (60 %) en taninos respecto a los de las plantas del invernadero (Figura 4.4 C). Las diferencias significativas en las concentraciones de saponinas y terpenos también fueron evidenciadas con los análisis cuantitativos; en el caso de las saponinas, los folíolos de las plantas *in situ* presentaron cerca de 60 % menos saponinas, pero el doble de terpenos respecto a los folíolos de las plantas del invernadero (Figura 4.4 D-E).



**Figura 4.2.** Proteína total (A), glucosa (B), fructosa (C) y sacarosa (D) en folíolos de *C. longirostrata* recolectados *in situ*, las Vigas, Ometepec, Guerrero, México y de folíolos de plantas cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. Cada barra representa el promedio de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar.



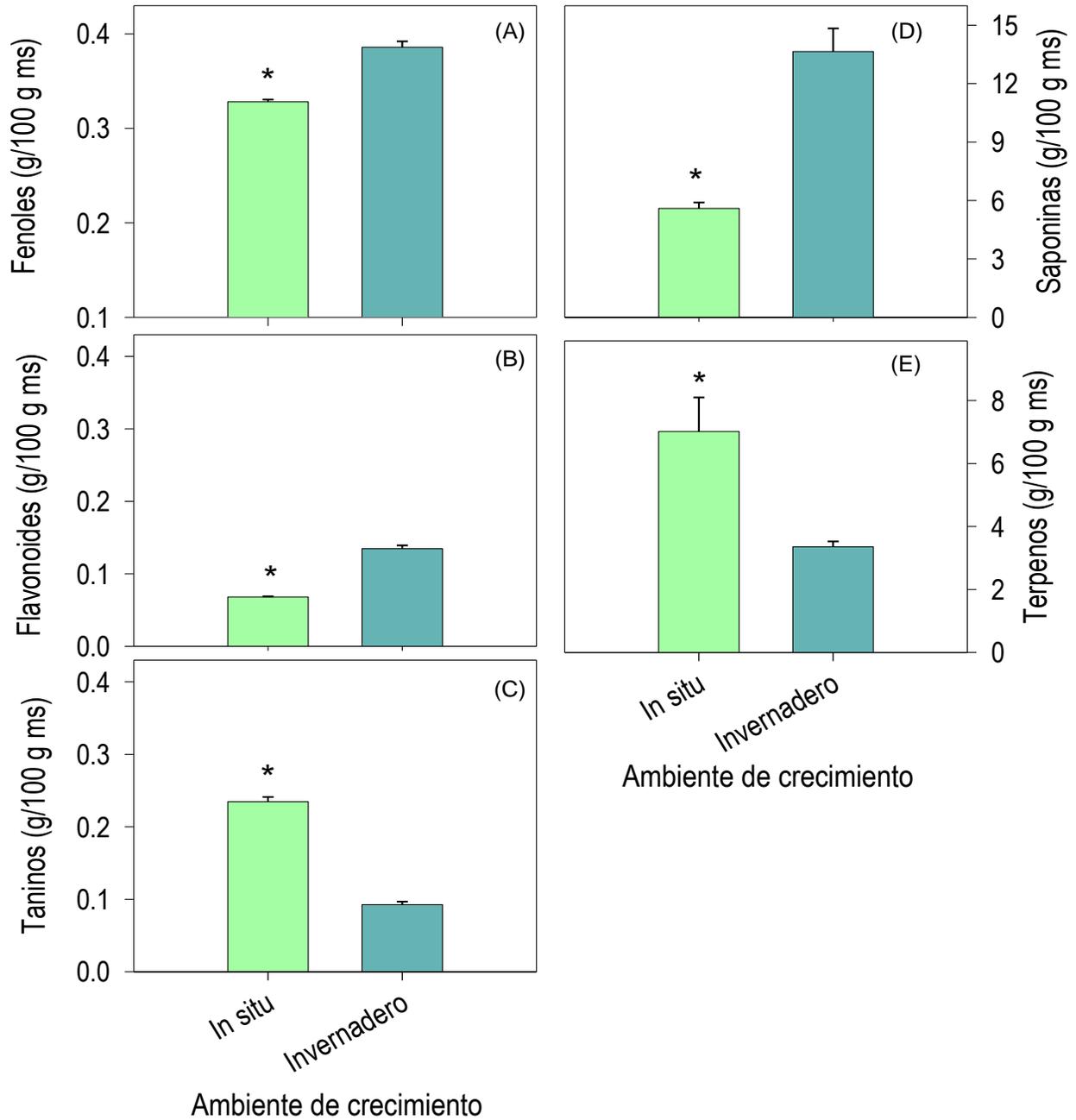
**Figura 4.3.** Concentración de almidón (A), hemicelulosa (B), fibra detergente ácido (C) y fibra detergente neutro (D) en folíolos de *C. longirostrata* recolectados *in situ*, las Vigas, Ometepec, Guerrero, México, y en folíolos de plantas cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. Cada barra representa el promedio de cuatro Repeticiones  $\pm$  error estándar.

**Cuadro 4.2.** Presencia, con abundancia relativa, o ausencia<sup>¶</sup> de grupos químicos del metabolismo especializado de folíolos, flores y ramas de plantas de *C. longirostrata in situ* y cultivadas en invernadero

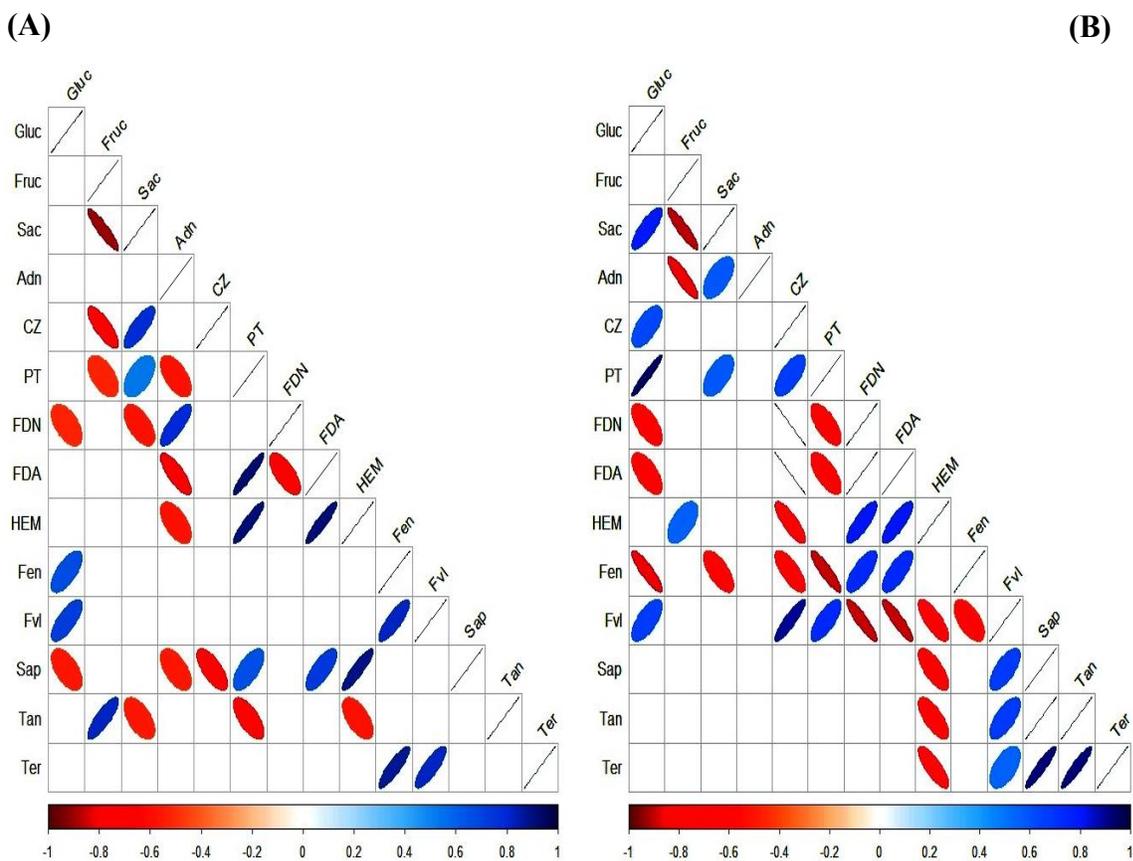
Tejido	Alcaloides	Fenoles	Flavonoides	Saponinas	Taninos	Terpenos
Tejidos recolectados <i>in situ</i>						
Folíolos	+++	+++	+	+++	++	+++
Flores	++	+++	+	++	++	+++
Ramas	++	+	+	++	+	++
Tejidos de plantas cultivadas en invernadero						
Folíolos	+	+++	++	+++	++	++
Flores	++	++	+	+++	+	+++
Ramas	-	+	-	+	+	+

Abundancia relativa: alta (+++), moderada (++), escasa (+), nula (-).

Mediante el método de Spearman se mostró que, entre las variables analizadas de los folíolos cosechados *in situ* existieron 15 correlaciones positivas ( $P \leq 0.05$ ), con coeficiente de correlación de 0.59 a 1, y 15 negativas ( $P \leq 0.05$ ) con coeficiente de correlación de -0.59 a -1, respectivamente (Figura 4.5).



**Figura 4.4.** Concentración de fenoles (A), flavonoides (B), taninos (C), saponinas (D) y terpenos (E) en folíolos de *C. longirostrata* recolectados *in situ*, las Vigas, Ometepe, Guerrero, México, y de folíolos de plantas cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. El asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa de acuerdo con la prueba t-Student ( $\alpha = 0.05$ ). Cada barra representa el promedio de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar.



**Figura 4.5.** Coeficientes de correlación ( $\rho$ ) de Spearman del contenido de minerales (Cz) y metabolitos en foliolos de *C. longirostrata* cosechados de plantas (A) *in situ*, las Vigas, Ometepe, Guerrero, México y (B) cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. El color de las elipses representa la intensidad de la correlación ( $\alpha=0.05$ ). Líneas diagonales o recuadros vacíos indican correlación máxima o mínima. Glu: glucosa, Fruc: fructosa, Sac: sacarosa, Adn: almidón, PT: proteína total, FDN: fibra detergente neutro, FDA: fibra detergente ácido, HEM: hemicelulosa, Fen: fenoles, Fvl: flavonoides, Sap: saponinas, Tan: taninos, Ter: terpenos.

Entre las asociaciones ( $P \leq 0.05$ ) positivas están los azúcares con los productos del metabolismo especializado, como la glucosa con fenoles y flavonoides, y la fructosa con los taninos. Entre las asociaciones negativas significativas se identificó la glucosa con las saponinas y a la sacarosa con los taninos. El almidón se correlacionó negativamente con las saponinas (Figura 4.5 A).

Las variables de los folíolos cosechados *in situ* presentaron correlaciones ( $P \leq 0.05$ ) positivas de la proteína total con la fibra detergente ácido, la hemicelulosa y las saponinas y, negativa, con los taninos (Figura 4.5 A).

Los folíolos de las plantas *in situ* tuvieron correlaciones ( $P \leq 0.05$ ) positivas entre los productos del metabolismo especializado, como fueron los terpenos con los fenoles y los flavonoides, así como los taninos con los fenoles y los flavonoides; aunque entre estos metabolitos no se detectaron correlaciones negativas (Figura 4.5 A).

El análisis mediante el método de Spearman mostró que en las variables evaluadas de los folíolos de plantas cultivadas en invernadero hubo 23 correlaciones positivas ( $P \leq 0.05$ ), con coeficiente de correlación de 0.59 a 1, y 20 negativas ( $P \leq 0.05$ ), con coeficiente de correlación de -0.59 a -1 (Figura 4.5 B).

Entre las asociaciones significativas y positivas de los componentes foliares de las plantas del invernadero están la de glucosa con sacarosa y flavonoides, y la de estos últimos con los minerales, proteína total, taninos, terpenos y saponinas. Igualmente se identificaron las correlaciones significativas y positivas de saponinas con los flavonoides y terpenos, y los taninos con terpenos. (Figura 4.5 B).

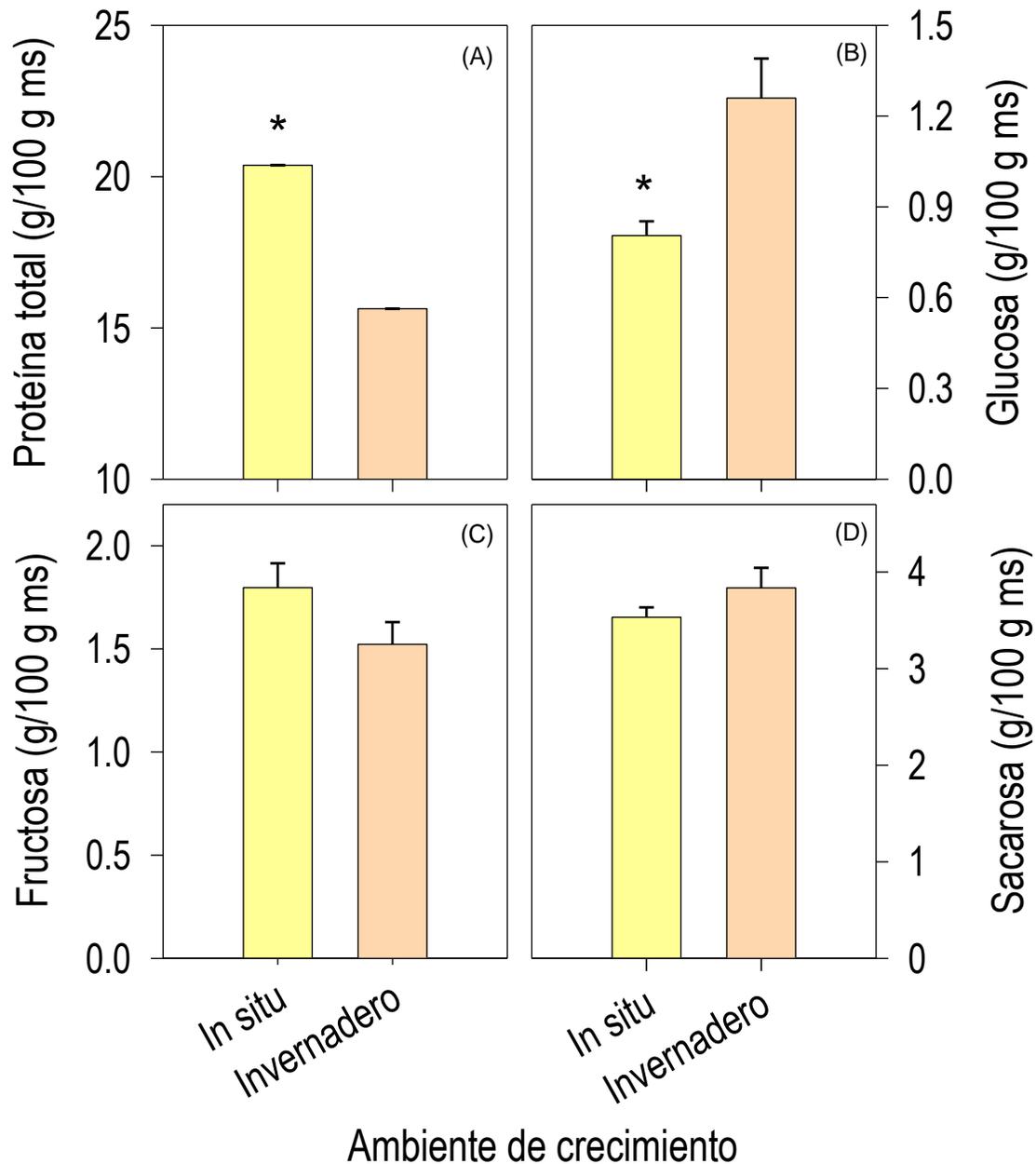
Además, entre las variables de los folíolos cosechados en plantas del invernadero se observaron correlaciones ( $P \leq 0.05$ ) negativas entre la glucosa con las fibras, entre la fructosa con la sacarosa y el almidón, la de hemicelulosa con flavonoides, saponinas, taninos y terpenos; también, los fenoles se correlacionaron ( $P \leq 0.05$ ) negativamente con la glucosa, sacarosa, minerales, proteína total y fenoles; además, los flavonoides con las fibras y fenoles (Figura 4.5 B).

#### 4.5.2 Flores

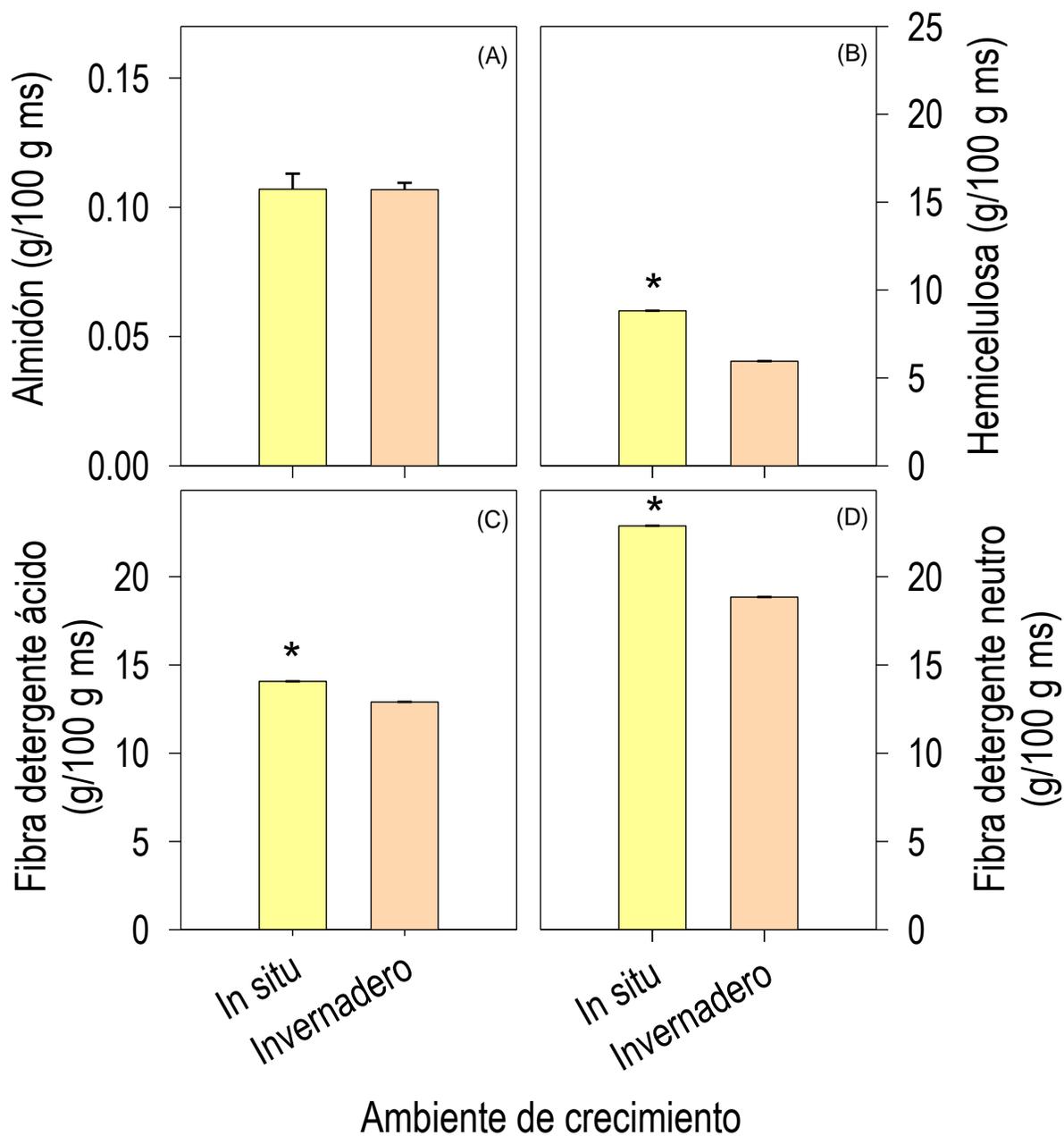
Las flores de las plantas *in situ* acumularon 4 % ( $P \leq 0.05$ ) más biomasa seca respecto a las que crecieron en invernadero; en contraste, la acumulada en los foliolos no fue significativa ( $P > 0.05$ ) entre su contenido de minerales fue cerca de la mitad ( $P \leq 0.05$ ) respecto a las del invernadero (Cuadro 4.1).

Las diferencias en las concentraciones de proteína total y de glucosa fue significativa entre las flores de los dos orígenes. Las flores recolectadas *in situ* contenían en promedio 23 % más proteína total, pero 36 % menos glucosa (Figura 4.6 A-B). En contraste, las diferencias en las concentraciones promedio de fructosa y sacarosa no fueron significativas ( $P > 0.05$ ) entre las flores de ambas procedencias (Figura 4.6 C-D).

En el caso de los polisacáridos, la concentración de almidón en las flores no difirió significativamente entre los orígenes (Figura 4.7 A); en contraste las flores de las plantas *in situ* contenían de 9 a 48 % más hemicelulosa o fibras de los dos tipos cuantificados (Figura 4.7 B-D).



**Figura 4.6.** Concentración de proteína total (A), glucosa (B), fructosa (C) y sacarosa (D) en flores de *C. longirostrata* recolectados *in situ*, las Vigas, Ometepec, Guerrero, México y de plantas cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. El asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa de acuerdo con la prueba t-Student ( $\alpha = 0.05$ ). Cada barra representa el promedio de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar.



**Figura 4.7.** Concentración de almidón (A), hemicelulosa (B), fibra detergente ácido (C) y fibra detergente neutro (D) en flores de *C. longirostrata* recolectados *in situ*, las Vigas, Ometepec, Guerrero, México, y de plantas cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. El asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa de acuerdo con la prueba t-Student ( $\alpha = 0.05$ ). Cada barra representa el promedio de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar.

El análisis cualitativo mostró presencia de los grupos de alcaloides, flavonoides, terpenos fenoles, saponinas y taninos en las flores recolectadas *in situ* y de invernadero. La abundancia relativa de los primeros tres grupos fue similar entre las flores y la de los otros tres grupos varió entre moderada y escasa (Cuadro 4.2), aunque esta no concordó con las determinaciones cuantitativas en la mayoría de los grupos de compuestos. Al respecto, las flores *in situ* acumularon 12 % menos fenoles y cerca de 90 % menos flavonoides respecto a las flores de las plantas de invernadero (Figura 4.8 A-B); además, las flores recolectadas *in situ* presentaron cerca de siete veces más taninos respecto a las del invernadero (Figura 4.8 C). También, las diferencias entre las concentraciones de saponinas y terpenos fueron significativas entre las flores, en el primer grupo de compuestos, las flores de las plantas *in situ* presentaron cerca de un tercio menos respecto a las flores del invernadero, pero cerca del doble de terpenos (Figura 4.8 D-E).

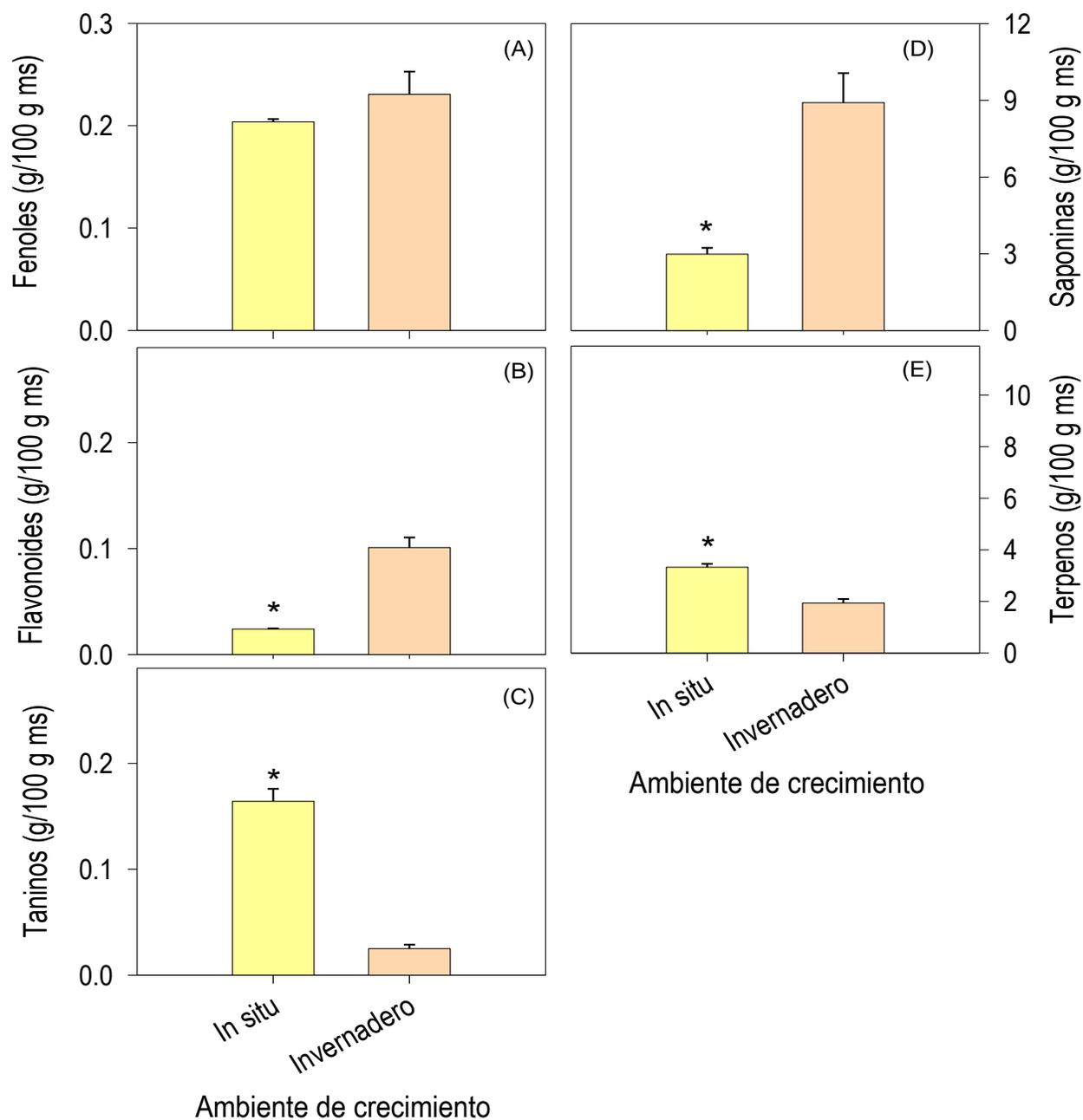
El análisis de las correlaciones, mediante el método de Spearman, entre los metabolitos de las flores cosechadas *in situ* mostró que, existieron 23 correlaciones significativas positivas, con coeficiente de correlación de 0.55 a 1 y seis negativas ( $P \leq 0.05$ ), con coeficiente de correlación de -0.58 a -0.89 (Figura 4.9 A).

Algunas de las asociaciones ( $P \leq 0.05$ ) positivas se observaron entre glucosa con fructosa, los minerales con fructosa y almidón, mientras que la proteína total se asoció positivamente ( $P \leq 0.05$ ) con estos dos últimos y los taninos, y entre las asociaciones negativas están glucosa con saponinas, y sacarosa con los taninos. También destacaron las asociaciones positivas de los fenoles, flavonoides y terpenos con las fibras y la de estas últimas con saponinas y terpenos; así como, la interacción positiva de fenoles con saponinas y terpenos, entre otras (Figura 4.9 A).

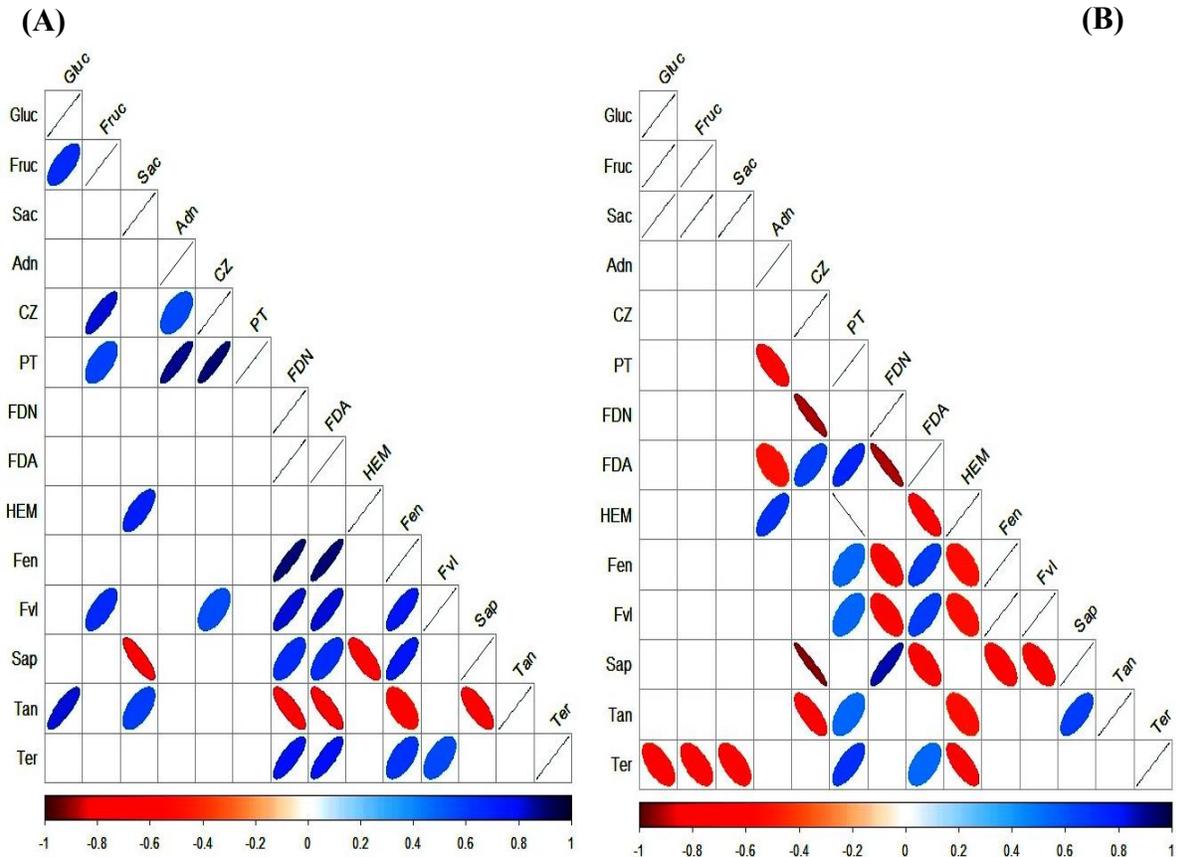
Los metabolitos de las flores cosechadas *in situ* destacaron por pocas asociaciones negativas significativas, como las de saponinas con sacarosa y taninos, y la de estos últimos con las fibras y los fenoles (Figura 4.9 A).

El análisis de correlación de las variables de las flores de las plantas cultivadas en el invernadero mostró 15 correlaciones positivas ( $P \leq 0.05$ ), con coeficiente de correlación de 0.59 a 1, y 20 negativas ( $P \leq 0.05$ ), con coeficiente de correlación de -0.59 a -1 (Figura 4.9 B).

Entre las asociaciones significativas y positivas de los componentes en las flores de las plantas del invernadero están la de glucosa con fructosa y sacarosa y las de este último azúcar con glucosa y fructosa. Así mismo, las correlaciones del contenido de proteína total con las de fibra detergente ácido, fenoles, flavonoides, taninos y terpenos fueron positivas y significativas. Entre los productos del metabolismo especializado destacó la correlación positiva ( $P \leq 0.05$ ) de taninos con saponinas (Figura 4.9 B).



**Figura 4.8.** Concentración de fenoles (A), flavonoides (B), taninos (C), saponinas (D) y terpenos (E) en flores de *C. longirostrata* recolectados *in situ*, las Vigas, Ometepec, Guerrero, México, y de plantas cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. El asterisco sobre las barras indica diferencia significativa o altamente significativa de acuerdo con la prueba t-Student ( $\alpha = 0.05$ ). Cada barra representa el promedio de cuatro repeticiones  $\pm$  error estándar.



**Figura 4.9.** Coeficientes de correlación ( $\rho$ ) de Spearman del contenido de minerales (Cz) y metabolitos en flores de *C. longirostrata* de plantas (A) *in situ*, las Vigas, Ometepec, Guerrero, México y (B) cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. El color de las elipses representa la intensidad de la correlación ( $\alpha = 0.05$ ). Líneas diagonales o recuadros vacíos indican correlación máxima o mínima. Glu: glucosa, Fruc: fructosa, Sac: sacarosa, Adn: almidón, PT: proteína total, FDN: fibra detergente neutro, FDA: fibra detergente ácido, HEM: hemicelulosa, Fen: fenoles, Fvl: flavonoides, Sap: saponinas, Tan: taninos, Ter: terpenos.

Algunas de las asociaciones negativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los componentes de las flores de las plantas del invernadero están la de almidón con proteína y fibra detergente ácido, los minerales con fibra detergente neutro, taninos y saponinas y estas últimas con fibra detergente ácido, fenoles y flavonoides. También destacaron, las correlaciones negativas ( $P \leq 0.05$ ) de los terpenos con azúcares solubles, glucosa, fructosa y sacarosa, y con hemicelulosa (Figura 4.9 B).

### 4.5.3 Ramas

Debido a que las ramas de las plantas de *C. longirostrata* no son alimento para los humanos, las concentraciones de proteína total, fibra detergente ácido, fibra detergente neutro y hemicelulosa, no se incluyeron en las evaluaciones. Las diferencias en la concentración de glucosa, fructosa y almidón en ramas de las plantas *in situ* respecto a ramas de plantas en invernadero no fueron significativas ( $P > 0.05$ ). En contraste, entre los metabolitos primarios cuantificados en ramas únicamente en la concentración de sacarosa hubo diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ); la concentración del disacárido fue tres veces mayor en ramas de plantas *in situ* respecto a las ramas de plantas producidas en invernadero (Cuadro 4.3).

El análisis cualitativo mostró presencia escasa o moderada de alcaloides, flavonoides, terpenos fenoles, saponinas y taninos en ramas recolectadas *in situ*. Los resultados obtenidos mostraron que los alcaloides y flavonoides estuvieron ausentes y la abundancia relativa de fenoles, saponinas, taninos y terpenos fue escasa en las ramas de plantas del invernadero (Cuadro 4.2). Las determinaciones cuantitativas en la mayoría de los grupos de compuestos difirieron del análisis cualitativo. Al respecto, las ramas de las plantas *in situ* acumularon 34 % menos fenoles y cerca de seis veces menos flavonoides ( $P \leq 0.05$ ) respecto a las ramas de plantas en invernadero; en contraste acumularon el doble ( $P \leq 0.05$ ) de taninos respecto a las ramas de plantas en invernadero (Cuadro 4.3).

**Cuadro 4.3.** Concentración de azúcares solubles, almidón y de los grupos de compuestos del metabolismo especializado (g/100 g) en ramas de *C. longirostrata* recolectados *in situ*, las Vigas, Ometepe, Guerrero, México, o de plantas cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Variable	Ambiente de crecimiento		Significancia <sup>¶</sup> ( $\alpha \leq 0.05$ )
	<i>In situ</i>	Invernadero	
Glucosa	0.3064	0.1783	N.S.
Fructosa	0.2230	0.1695	N.S.
Sacarosa	0.8241	0.2613	*
Almidón	0.1001	0.1039	N.S.
Flavonoides	0.0089	0.050	**
Fenoles	0.0716	0.108	*
Saponinas	1.4758	5.620	**
Taninos	0.0428	0.022	*
Terpernos	1.7998	0.935	N.S.

<sup>¶</sup> Prueba t-Student, N.S. no significativa, \*\* altamente significativa con  $P \leq 0.001$  y \* significativa con  $P \leq 0.05$ .

Las ramas de plantas que crecieron *in situ* tuvieron la cuarta parte de concentración de saponinas de la presente en ramas de plantas en invernadero, mientras que los terpenos no mostraron variación ( $P > 0.05$ ) entre las ramas de ambos grupos de plantas (Cuadro 4.3).

El análisis de correlación de Spearman, en ramas de plantas *in situ*, mostró ocho correlaciones positivas ( $P \leq 0.05$ ), con coeficiente de correlación de 0.59 a 1, y diez negativas ( $P \leq 0.05$ ), con coeficiente de correlación. de -0.59 a -1 (Figura 4.10 A).

Entre las asociaciones significativas y positivas de los componentes en las ramas de las plantas *in situ* están la de glucosa con los flavonoides, saponinas y terpenos; además, la fructosa se

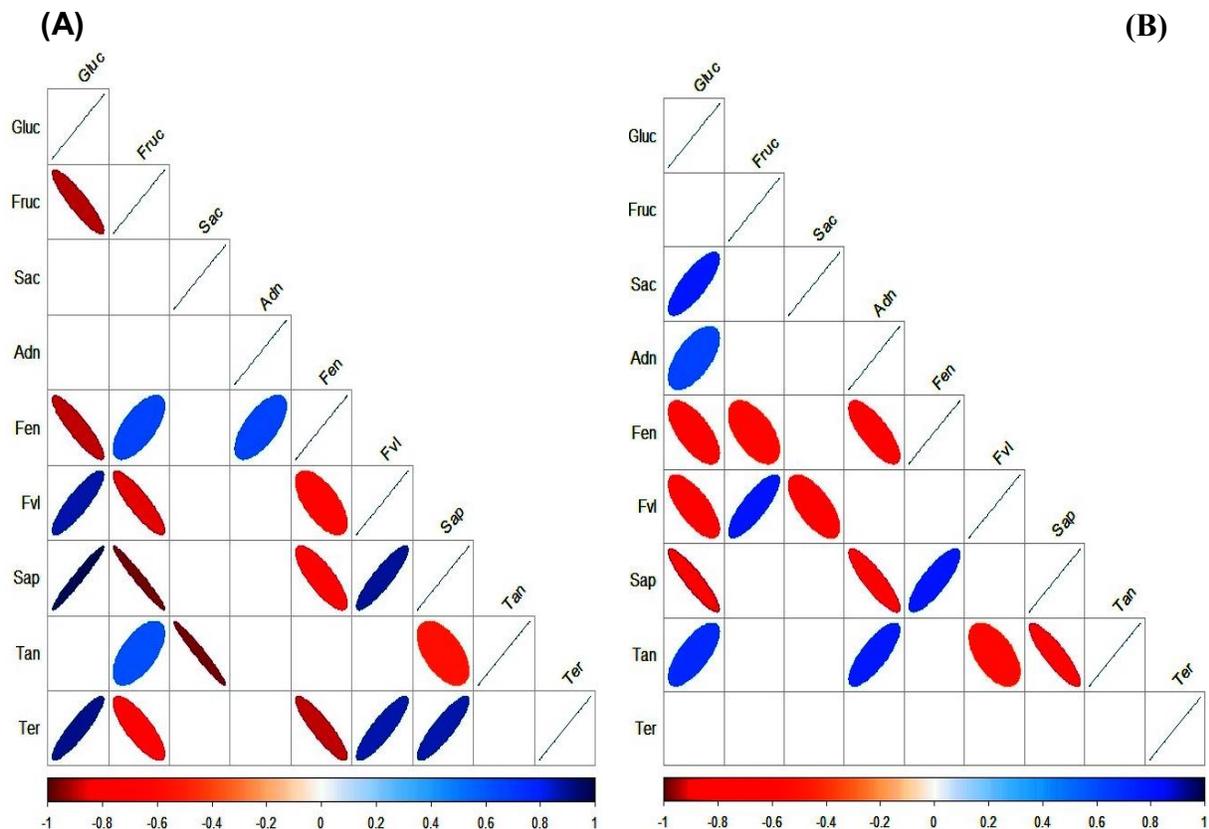
correlacionó positivamente con taninos y fenoles, y el almidón con estos últimos. También fueron positivas las correlaciones entre terpenos con flavonoides y saponinas (Figura 4.10 A).

Las correlaciones ( $P \leq 0.05$ ) negativas se identificaron entre glucosa con fructosa y fenoles, entre fructosa con flavonoides, saponinas y terpenos y entre sacarosa con taninos. Entre las correlaciones ( $P \leq 0.05$ ) negativas de los productos del metabolismo especializado se identificaron los fenoles con flavonoides, saponinas y terpenos y saponinas con terpenos (Figura 4.10 A).

En las ramas de las plantas cultivadas en el invernadero, el análisis de correlación de Spearman, mostró seis correlaciones positivas ( $P \leq 0.05$ ), con coeficiente de correlación de 0.59 a 1 y nueve negativas ( $P \leq 0.05$ ), con coeficiente de correlación de -0.59 a -1 (Figura 4.10 B).

Entre las asociaciones significativas y positivas de los componentes en las ramas de las plantas del invernadero están glucosa con sacarosa, el almidón y taninos; y la de estos últimos con almidón. Además, la fructosa se correlacionó positivamente con flavonoides, los fenoles con saponinas (Figura 4.10 B).

La glucosa se correlacionó negativamente ( $P \leq 0.05$ ) con sacarosa, fenoles, flavonoides y saponinas, la fructosa con fenoles, la sacarosa con flavonoides y el almidón con fenoles y saponinas. Las asociaciones ( $P \leq 0.05$ ) negativas de los productos del metabolismo especializado fueron entre los taninos con flavonoides y saponinas (Figura 4.10 B).



**Figura 4.10.** Coeficientes de correlación ( $\rho$ ) de Spearman del contenido de minerales (Cz) y metabolitos en ramas de *C. longirostrata* de plantas (A) *in situ*, las Vigas, Ometepec, Guerrero, México y (B) cultivadas en invernadero, Montecillo, Texcoco, Estado de México. El color de las elipses representa la intensidad de la correlación ( $\alpha = 0.05$ ). Líneas diagonales o recuadros vacíos indican correlación máxima o mínima. Glu: glucosa, Fruc: fructosa, Sac: sacarosa, Adn: almidón, Fen: fenoles, Fvl: flavonoides, Sap: saponinas, Tan: taninos, Ter: terpenos.

#### 4.5.4 Suelo

El suelo agrícola empleado en el invernadero tuvo textura diferente al de Las Vigas. El color, incluyendo sus parámetros como el brillo, el matiz y la pureza, fue similar en ambos suelos. En tanto, las variables relacionadas con la composición y las características fisicoquímicas contrastaron entre ellos. Respecto a la composición, el suelo del invernadero mostró mayor proporción de arcillas, arenas y N total comparado con el de Las Vigas, mientras el contenido de

limo y materia orgánica fue mayor que en este último. Las diferencias de estos componentes son destacables ya que el suelo agrícola mostró 86 % menos materia orgánica y 35 veces más N total. El suelo del invernadero mostró conductividad eléctrica 65 veces mayor, el doble y diez veces más Ca y K intercambiables, sólo trazas de Mg y once veces menos P intercambiables respecto al suelo de Las Vigas (Cuadro 4.4).

**Cuadro 4.4.** Características físicas y químicas del suelo de la localidad Las Vigas, Guerrero, México y de suelo agrícola de Montecillos, Estado de México.

	<b>Localidad</b>	
	<b>Las Vigas</b>	<b>Montecillos</b>
Matiz (hue)	10YR	10YR
Brillo (value)	4	4
Pureza	3	2
Textura	Franco arenoso	Arena migajosa
Arcilla (%)	7	9
Arenas (%)	59	79
Limos (%)	34	12
Materia orgánica (%)	2.017	0.280
N total (%)	0.023	0.800
Densidad aparente (g/cm <sup>3</sup> )	1.52	1.40
Densidad real (g/cm <sup>3</sup> )	2.68	2.48
Capacidad de campo (%)	18.84	22.00
Punto de marchitez permanente (%)	9.43	7.00
Conductividad eléctrica (dSm <sup>-1</sup> )	0.02	1.30
pH (1:2 y 1:3 suelo:agua)	5.46	7.1
Bases intercambiables		
Ca (cmol <sup>(+)</sup> kg <sup>-1</sup> )	1.590	3.000
Mg (cmol <sup>(+)</sup> kg <sup>-1</sup> )	0.720	Trazas
K (cmol <sup>(+)</sup> kg <sup>-1</sup> )	0.325	3.500
P (cmol <sup>(+)</sup> kg <sup>-1</sup> )	0.271	0.024

## 4.6 DISCUSIÓN

El consumo de las plantas o de sus estructuras depende de su composición química, es decir cantidad y calidad de sus componentes, y se centra en las especies alimenticias con frutos, semillas, hojas, raíces u otras estructuras ricas en proteínas, lípidos, carbohidratos, y otros productos del metabolismo vegetal (Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, 2012). La digestibilidad de este grupo de alimentos está directamente relacionada con el tipo y cantidad de fibra alimentaria (Yang *et al.*, 2022). Algunos compuestos del metabolismo especializado en los tejidos de las plantas pueden provocar toxicidad y alterar la digestibilidad y absorción de nutrientes, así como la fisiología de los consumidores (Ortiz *et al.*, 2014). Al respecto, López-Palacios y Peña-Valdivia (2020) señalaron que los productos del metabolismo especializado son un grupo de compuestos bioactivos diversos y su concentración está relacionada con el grado de domesticación de las especies vegetales y el ambiente de crecimiento. Por lo que, el estudio de la composición de alimentos nativos y de plantas silvestres, como Chipilín, que son parte del sistema alimentario de los pueblos indígenas es relevante (Sotelo *et al.*, 2007; Pérez-José *et al.*, 2019; FAO, 2021).

Este estudio mostró que la composición química de los folíolos, las flores y las ramas de *C. longirostrata* se modifica parcialmente con el ambiente de crecimiento. En general, el clima *in situ* y el ambiente en el invernadero fueron similares en las temperaturas mínimas y máximas y la humedad no fue restrictiva. La fertilidad del suelo, en características físicas y químicas difirió entre los sitios de crecimiento. La concentración de nueve de los 13 productos del metabolismo primario y especializado cuantificados en el estudio fueron significativamente diferentes en los folíolos y en las flores. En las ramas no se analizó el contenido de proteína y de la fibra alimentaria, debido a que no son alimento para humanos y el interés en ellas se basa en su riqueza de compuestos del metabolismo especializado (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2020; Pérez-Villatoro *et al.*, 2020); en estas

estructuras, cinco de los nueve productos del metabolismo cuantificados difirieron entre los sitios de crecimiento.

Los folíolos y las flores de las plantas del invernadero acumularon más minerales (Cuadro 4.1). La concentración superior de minerales en ambas estructuras de las plantas del invernadero tuvo efecto en las correlaciones significativas con los metabolitos primarios y del metabolismo especializado, aunque en forma diferenciada en cada uno de ellos (Figuras 4.9 y 4.10). Estas diferencias son atribuibles al ambiente de crecimiento, en el que destacó el contraste en las propiedades físicas y químicas del suelo, y a su interacción con el genotipo (Mwakha *et al.*, 2020).

El contenido de materia seca en los folíolos de este estudio fue mayor respecto a los observados en plantas recolectadas en Guatemala y Veracruz, México (Arias *et al.*, 2003; Guerra-Centeno *et al.*, 2016), lo que indica mayor acumulación de metabolitos primarios y especializados, minerales, o todos ellos, respecto a los de esos estudios. En el caso de los minerales, en promedio los folíolos de las plantas cultivadas en invernadero y los de las plantas de Las Vigas acumularon cantidad similar (9.2 y 8.0 %) de minerales al de hojas recolectadas en Veracruz (Arias *et al.*, 2003) y Guatemala (Guerra-Centeno *et al.*, 2016). En contraste, el contenido de minerales de los folíolos de ambos grupos de plantas fue mayor (entre 67 y 77 %) al documentado en las tablas de composición de alimentos en hojas de *C. longirostrata* (Muñoz *et al.* 2010; INCAP, 2012; Morales *et al.*, 2016). Todos estos valores mostraron que los folíolos de Chipilín aportan mayor cantidad de minerales a los consumidores comparada con otros vegetales de hojas verdes, como verdolaga (*Portulaca oleracea* L.; Ghanimi *et al.*, 2022), espinaca (*Spinacia oleracea* L.) y acelga (*Beta vulgaris* L.; Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, 2012; Mzoughi *et al.*, 2019; Waseem *et al.*, 2021). La composición química de las flores de *C. longirostrata* no se había documentado antes del presente estudio; por lo que, los referentes pueden ser las flores comestibles

de otras especies. El contenido de minerales de las flores de este estudio (6.0 a 11.0 %) fue mayor al de flor de calabaza *Cucurbita máxima* L. (1.3 a 3 %), otra especie comestible (Ghosh y Rana, 2021; Bieżanowska-Kopeć *et al.*, 2022). Esto indicó que la flor de Chipilín podría cubrir los requerimientos diarios de minerales.

La proteína cruda de los folíolos y las flores de las plantas cultivadas fue menor al de las mismas estructuras de las plantas de Las Vigas. Las diferencias parece que dependen de la calidad nutrimental del suelo en el que crecieron las plantas.

La concentración promedio de proteína cruda de los folíolos (23 %) de este estudio fue análoga al de hojas de Chipilín de Tabasco, México (Pérez-Cornelio *et al.*, 2016) y mayor a los valores (7 %) en las tablas de composición de alimentos en hojas de *C. longirostrata* (Muñoz *et al.* 2010; INCAP, 2012; Morales *et al.*, 2016). En contraste, el promedio fue menor al de las hojas de plantas de Veracruz, México (38.3 %) y de Guatemala (50 %) (Arias *et al.*, 2003; Guerra-Centeno *et al.*, 2016). Sin embargo, estos últimos valores son atípicos en estructuras foliares y coinciden o son superiores a los de granos de cereales y leguminosas (Muñoz *et al.* 2010; INCAP, 2012; Morales *et al.*, 2016).

En este estudio la concentración de los monosacáridos en los folíolos no se modificó con el cultivo respecto a las plantas *in situ* y la concentración de sacarosa fue menor; al contrario, con el cultivo la glucosa fue mayor en las flores. Las flores de ambos grupos de plantas presentaron concentraciones significativas mayores que los folíolos. Los azúcares solubles son representantes del metabolismo del C y participan en la expresión de genes, en la respuesta y la adaptación de las plantas al estrés ambiental como osmolitos y moléculas de señalización (Wang *et al.*, 2018). La concentración mayor de sacarosa del tejido fuente, *i.e.*, folíolos, *in situ* puede ser efecto de factores

múltiples como es, el sombreado parcial entre plantas, situación no presente en invernadero. Al respecto, en un estudio realizado en hojas de plantas de cempasúchil (*Tagetes erecta* L.), con y sin sombra, se observó que a mayor sombreado se incrementó la concentración de azúcares (Peralta *et al.*, 2020). La presencia de cantidades superiores de azúcares en flores también se ha documentado en *Malva sylvestris* L. (Petkova *et al.*, 2019). Aunque la concentración de almidón en folíolos y flores no se modificó entre los ambientes de crecimiento de las plantas, las correlaciones significativas entre los carbohidratos disponibles mostraron similitudes y contrastes relevantes. En los folíolos la concentración de fructosa incrementó a expensas de la sacarosa independientemente del ambiente de crecimiento; únicamente en el ambiente del invernadero la fructosa también incrementó a expensas del almidón y la glucosa incrementó paralelamente con la sacarosa y esta última con el almidón. En las flores las correlaciones mostraron que la glucosa incrementa junto con la fructosa en ambos ambientes, y únicamente en el ambiente de invernadero los monosacáridos incrementaron simultáneamente con la sacarosa y, a la vez, ésta incrementó con el almidón en las flores. Estos resultados indicaron que el metabolismo del C se modificó parcialmente con el cultivo de las plantas en invernadero.

Los folíolos de Chipilín contienen más azúcares que las hojas de acelga (0.04 a 0.2 g/100g ms) (Mzoughi *et al.*, 2019). La concentración de ciertos azúcares, como la sacarosa puede presentarse en respuesta a temperaturas bajas durante el crecimiento de la planta (Wei *et al.* 2017); sin embargo, en el presente estudio la temperatura de crecimiento *in situ* y en el invernadero fueron similares, por lo que no fue un factor que permita explicar la diferencia de la concentración del disacárido en los folíolos de las plantas *in situ*. Kan *et al.* (2018) señalaron que la sacarosa es el azúcar dominante en las leguminosas, aunque puede diferir entre condiciones de crecimiento.

El ambiente de cultivo no modificó los polisacáridos estructurales y otros componentes de las paredes celulares, en este estudio representados por la fibra detergente ácido, *i.e.*, celulosa, lignina, proteínas y cierto tipo de hemicelulosa y pectinas (Jaimes *et al.*, 2019). Esta información, complementada con la cuantificación de la fibra detergente neutro permite confirmar que los folíolos y las flores de las plantas del invernadero acumularon más hemicelulosa y probablemente más pectinas, ambos tipos de polisacáridos predominan en la fibra alimentaria soluble. Además, los resultados indican que la composición de la pared celular en los folíolos y en las flores se modificó parcialmente con el cultivo en invernadero. Al respecto, las paredes celulares brindan soporte mecánico a las células vegetales durante el crecimiento, desarrollo y adaptación a su entorno cambiante, el que no es necesariamente estresante; opuesto a lo planteado hasta hace unos años, son estructuras altamente dinámicas, químicamente complejas y con percepción de fuerzas físicas y estímulos químicos en su interface con la membrana plasmática (Vaahtera *et al.*, 2019). Las interacciones entre las plantas y su entorno son de naturaleza física o química (Lamers *et al.* 2020; Gall *et al.* 2015). Los primeros incluyen luz, temperatura, presión de turgencia y fuerzas mecánicas (debidas al crecimiento celular), esto se complementa con el aporte de nutrientes (Vaahtera *et al.*, 2019; Bacete y Hamann 2020;). La integridad funcional de la pared celular depende de factores múltiples, entre los que destaca su composición con cambios en el metabolismo de los carbohidratos (Vogel *et al.*, 2004; Hamann *et al.*, 2009;). Al respecto, destacó la correlación negativa y significativa en los folíolos, de las plantas en ambos ambientes, entre la concentración de fibra detergente neutro y la concentración de azúcares en los folíolos independientemente del ambiente de crecimiento; es decir, la síntesis de polisacáridos estructurales disminuye la disponibilidad de carbono. Esta relación fue menos evidente u opuesta en las flores, probablemente porque este es un órgano demanda.

Los contenidos de hemicelulosa de los foliolos de este estudio coincidieron con los de hojas de Chipilín recolectadas en Veracruz, México, pero con concentración hasta 34 y 60 % mayor de fibra detergente ácido y fibra detergente neutro (Arias *et al.*, 2003). El contenido de fibra alimentaria, cuantificada con el método de AOAC (2005) en las flores comestibles de calabaza (*Cucurbita* sp.), colorín (*Erythrina berteroana*), garambullo (*Myrtillocactus geometrizans* Console), maguey (*Agave atrovirens*) y yuca (*Yucca aloifolia* L.) varía entre 6.1 y 17.30 % (INCAP, 2012). Con este método de análisis se eliminan la mayor parte de la fibra soluble (pectinas y una parte de hemicelulosa), inclusive una porción de celulosa (Jaimes *et al.*, 2019). Aunque la concentración de fibra y hemicelulosa del presente estudio no son comparables con aquellos de las tablas de composición de alimentos (INCAP, 2012) permiten reconocer la variabilidad de contenido de fibra en las flores comestibles y restar relevancia a las diferencias relativamente menores en el presente estudio. En relación con la característica de la fibra alimentaria en flores, Mrázková *et al.* (2021) señalaron que a pesar de su contenido relativamente alto de fibra en las flores comestibles sus valores de digestibilidad son buenos. El contenido de fibra en las verduras es esencial para la digestibilidad de los alimentos, además que se ha reconocido que la ingestión de fibra es de gran beneficio para la salud humana (Obregón-Cano *et al.*, 2019).

Entre los productos del metabolismo especializado en las plantas están los que tienen efectos benéficos en los humanos, por ingestión de los alimentos que los contienen o mediante la herbolaria, y los que alteran su metabolismo, denominados factores antifisiológicos (Makkar *et al.*, 2009).

Los productos del metabolismo especializado pueden: no ser esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, estar presentes únicamente en ciertas fases de desarrollo, ser indetectables y su presencia dependiente de la especie vegetal; además, estos metabolitos coadyuvan a la

adaptación y evolución de las especies (Viladomat y Bastida, 2015; Li *et al.*, 2020). Los procesos biosintéticos naturales del metabolismo especializado están identificados en tres grandes grupos, *i.e.*, compuestos fenólicos que incluyen cumarinas, flavonoides, lignina y taninos; terpenoides que incluye a los isoprenoides y compuestos nitrogenados entre los que están glucósidos cianogénicos, alcaloides y glucosinolatos (Fang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2020). Las plantas de *C. longirostrata* se caracterizan por la presencia de compuestos del metabolismo especializado (Ranhotra *et al.*, 1998; Arias *et al.*, 2003; Bibi *et al.*, 2015; Ek-Chulim *et al.*, 2018; Miranda-Granados *et al.*, 2018; Cruz-Rodríguez *et al.*, 2020; Mateos-Maces *et al.*, 2020). Este estudio confirmó la actividad destacada del metabolismo especializado en las plantas de *C. longirostrata*, independiente del ambiente de crecimiento, ya que los análisis cualitativo y cuantitativo revelaron presencia y abundancia de integrantes de los grandes grupos ya citados en los folíolos, flores y ramas. El ambiente de crecimiento modificó las tasas de síntesis de algunos de esos compuestos integrantes de los grandes grupos; en las condiciones de cultivo del invernadero los folíolos, flores y ramas acumularon más fenoles, flavonoides y saponinas, y menos taninos y terpenos respecto a las Vigas. El contenido de fenoles en el presente estudio es análogo al de folíolos de *C. longirostrata* de plantas cultivadas en Houston, EE.UU. (Jiménez-Aguilar *et al.*, 2015) y de Chiapas, México (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2017), menores (0.138) a los de un supermercado local en Chiapas, México (Navarro-Flores *et al.*, 2020) y superiores (2.5 g/100g ms) a otros recolectados en Chiapas (López-López *et al.*, 2022). El contenido de flavonoides (0.1 g/100g ms) fue mayor al de las hojas de plantas recolectadas en Chiapas (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2017) y cultivadas en Houston, EE.UU., (Jiménez-Aguilar *et al.*, 2015) y el de saponinas (0.32) de ramas fue menor al de las plantas recolectadas en Chiapas (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2017).

El contenido de flavonoides de las plantas cultivadas en invernadero del presente estudio fue mayor a lo encontrado por Jiménez-Aguilar *et al.* (2015) en folíolos de *C. longirostrata*. La concentración de taninos en los folíolos de las plantas de las Vigas fue mayor e igual al de los folíolos y las ramas de las plantas del invernadero que el de las estructuras equivalentes recolectadas de plantas en Guatemala (Cáceres *et al.*, 2019). Estas diferencias sumadas a las del metabolismo primario indican que el cultivo modifica parcialmente el metabolismo del C y del N; en este estudio, las mayores diferencias entre los ambientes de cultivo fue la fertilidad del suelo.

Los taninos en concentración baja presentan actividad antioxidante (Ghosh, 2015); además, los compuestos polifenólicos y los flavonoides son potentes antioxidantes y benefician la salud humana por su papel en la disminución del envejecimiento celular e incidencia de cáncer (Randhawa *et al.*, 2015; Ahmed *et al.* 2018). Varios de los metabolitos especializados de *C. longirostrata* actúan como fungicida, antimicrobianas, antiinflamatorios y antioxidante (Liyana-Pathirana y Shahidi, 2006; Wojdyło *et al.*, 2007; Bibi *et al.*, 2015; Miranda-Granados *et al.*, 2018; Cruz-Rodríguez *et al.*, 2020). Sin embargo, actualmente no existen recomendaciones específicas para la ingesta diaria de la mayoría de los productos del metabolismo especializado.

En general, los metabolitos que cambiaron en los folíolos de las plantas cultivadas coincidieron con los de las flores, las diferencias correspondieron a la concentración de sacarosa, que fue menor, y la de los fenoles, que fue mayor en los folíolos de las plantas del invernadero. En el caso de las flores de estas últimas, la concentración de glucosa fue mayor y la de la fibra detergente ácido fue menor comparadas con las de las plantas de las Vigas. Los resultados permiten sugerir disminución de la síntesis (o degradación) de la proteína cruda, la hemicelulosa, los terpenos y los taninos en las plantas cultivadas en el invernadero y de sacarosa sólo en los folíolos. Al contrario, se evidenció la activación de la síntesis de saponinas y flavonoides en las plantas cultivadas en el invernadero;

además de los fenoles únicamente en los foliolos, respecto a las plantas de las Vigas. Con excepción de la sacarosa, los cambios significativos se identificaron en los grupos de compuestos del metabolismo especializado en las ramas.

#### **4.7. CONCLUSIONES**

La composición química de los folíolos, ramas y las flores de las plantas de *C. longirostrata* se modifica parcialmente con el ambiente de crecimiento.

Los folíolos y las flores de *C. longirostrata* pueden ser suplementos alimenticios por su contenido de proteína y minerales, así como la presencia de compuestos fenólicos y terpenos.

## DISCUSIÓN GENERAL

Las hojas jóvenes de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. (Chipilín) son alimento para humanos y animales, y se usan en herbolaria desde la época prehispánica en México y Centroamérica, donde crecen silvestres, como arvenses o cultivadas incipientemente (FAO, 2018; Arias *et al.*, 2003; Rzedowski *et al.*, 2016). FAO (2018) describe a *C. longirostrata* como una de las 16 especies registradas como comestibles por las poblaciones étnicas, campesinas y ciudadinas de Mesoamérica. En la literatura se documenta el consumo del follaje, que incluye los brotes tiernos, las hojas y los tallos jóvenes; sin embargo, en el presente estudio, como resultado de los recorridos por los mercados locales de Las Vigas, Ometepec y Llano Grande de los Hilarios Igualapa, Guerrero, México, se documenta la venta de las inflorescencias de Chipilín para consumo humano, similar a la flor de calabaza.

Además de que las hojas son fuente de carotenoides, vitamina C, Fe, Ca y proteínas; el follaje de *C. longirostrata* es rico en productos del metabolismo especializado, incluidos los compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, cumarinas, taninos, antraquinonas, antronas y alcaloides (Arias *et al.*, 2003; Bibi *et al.*, 2015; Cruz-Rodríguez *et al.*, 2017). Se ha demostrado que, debido a la presencia de estos compuestos, los extractos de los tallos, ramas y raíces de Chipilín inhiben el desarrollo del micelio y la esporulación de fitopatógenos y fitoparásitos como *Fusarium* sp., *Aspergillus flavus* Link (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2017-2020; Miranda-Granados *et al.*, 2018) y nematodos (Villar y Zavaleta-Mejía, 1990). Todas las estructuras de la planta se han evaluado en usos nuevos en herbolaria (Arias *et al.*, 2003; Basurto-Peña, 2011; Fischler y Wortmann, 1999), como abono verde (Desaeger y Rao, 2000), forraje (Arias *et al.*, 2003), alimento para el cultivo y multiplicación de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus* L.) (Guerra-Centeno *et*

*al.*, 2016) y caracoles de agua dulce (*Pomacea flagellata* Say) que son alimento, rico en proteína, para humanos (Martínez, 2016).

Los usos tradicionales de chipilín, los actuales y los documentados como potenciales indican que su demanda tendrá soporte con su cultivo comercial. Lo que también asegura la disponibilidad de plantas para los consumidores regionales y externos y en diferentes épocas del año (Camarillo-Castillo y Mangan, 2020). Un obstáculo para el cultivo de *C. longirostrata*, como se ha documentado en otras especies de *Crotalaria*, es la falta de semilla comercial (Vinicius de Araujo *et al.*, 2018). En el presente estudio se sugiere utilizar las semillas de poblaciones silvestres para el cultivo comercial de Chipilín, con lo que se aseguraría follaje e inflorescencias para consumo humano y semilla para la producción continua. Este es el caso de *C. brevidens* y *C. ochroleuca* que se produce en diversas regiones de África (Mwakha *et al.*, 2020).

Por lo anterior, otro objetivo de este estudio fue conocer el potencial agronómico de las plantas de *C. longirostrata* que crecen *in situ*, mediante la cuantificación del rendimiento y sus componentes de plantas *in situ*, y evaluar la posibilidad de su cultivo en ambiente parcialmente controlado en invernadero. Actualmente no se ha documentado la calidad o potencial agronómico de *C. longirostrata* en cultivo.

Debido a que la producción y el rendimiento de semilla son resultado de las interacciones entre el genotipo (Mwakha *et al.*, 2020) y el ambiente, que incluye factores como la radiación solar, la temperatura, la disponibilidad de humedad y de nutrientes en el suelo (Rouached y Rhee, 2017) como parte del objetivo antes señalado se incluyó la evaluación de los componentes del rendimiento, con énfasis en la producción de semilla y su calidad física y fisiológica, de plantas silvestres de *C. longirostrata* de tres sitio. Estos contrastaron parcialmente en clima, vegetación y

tipo de suelo del estado de Guerrero, México. Los sitios se describieron como: (1) con manejo agrícola y ganadero (MAG) en Las Vigas, (2) Con actividad urbana (AU) en Ometepec y (3) sin actividad antrópica (SAA) en Llano Grande de los Hilarios Igualapa. Algunas diferencias entre los sitios son su altitud, que va de 264 a 778 m s.n.m., la precipitación media anual es de 1100 mm a 1500 mm y temperatura media anual está en intervalos de 25-28, 26-28 y 18-26° C, respectivamente (García, 2004; CONAGUA, 2021). Además, en el estudio se determinaron diferencias relevantes en el tipo, composición y otras características del suelo de los tres sitios. Este fue el caso de la proporción de arenas que fue 24 % mayor ( $P \leq 0.05$ ) en MAG y AU, respecto a SAA; en contraste, en esta última los limos fueron 34.29 % más abundantes que en los otras dos. Las localidades MAG y SAA fueron en promedio 21 % más ricas ( $P \leq 0.05$ ) en materia orgánica respecto a AU y las concentraciones de los macroelementos N, P y K difirieron en los tres sitios. La localidad AU presentó 55 % más N total y, junto con SAA, (9 %) menos K soluble. Aunque, el K intercambiable no difirió entre las localidades, la concentración de P extraíble mostró el gradiente:  $MAG > AU > SAA$ , en el que la última localidad mostró hasta cinco veces menos P que MAG. La densidad aparente y la densidad real, que se relaciona con la compactación del suelo, fueron mayores en el suelo de la localidad AU. Además, la capacidad de campo y el punto de marchitez permanente del suelo mostraron el siguiente gradiente entre las localidades:  $SAA > AU > MAG$ , en el que los valores de estas dos características en la localidad SAA fueron 31.06 y 27.29 % mayores que en MAG. Aunque el pH y el Mg intercambiable no fue diferente entre las localidades, el Ca intercambiable mostró el siguiente gradiente  $AU > MAG > SAA$ , en el que los valores en AU fueron 38 % mayores que en SAA (Capítulo 3).

Las plantas recolectadas fueron arbustiformes, tuvieron tallo central erecto, leñoso sólo en su parte inferior (tallo sufruticoso), con altura mayor a 150 cm, frutos aun indehiscentes y valvas

color castaño oscuro, similares a las descritas por Azurdía (2016) y Soto-Estrada (2004). Además, las plantas más productivas, con mayor número de ramas, racimos y frutos por planta, número de frutos por racimo y por rama, número de semillas por rama y por planta y rendimiento de semilla se desarrollaron en la localidad MAG, con suelo franco arenoso, con capacidad de campo y punto de marchitez permanente menores, pero con capacidad de intercambio catiónico, y contenido de P y K intercambiable mayores respecto a los otros sitios. Además, el sitio MAG es una zona con potreros y cultivos, como maíz y frijol, cercanos. En contraste, las plantas con los valores significativamente menores de esos componentes del rendimiento y del rendimiento correspondieron a la localidad SAA, en suelo franco limoso, con pendiente de 25°, entre cerros y con capacidad de campo, punto de marchitez permanente, conductividad eléctrica y N total mayores respecto al de los otros sitios; además, esas plantas con los rendimientos menores crecieron en suelo con menor contenido de Ca intercambiable y P extraíble, respecto a los otros sitios. Al contrario, el pH y el contenido de Mg y de K intercambiable fueron similares en las tres localidades, por lo que no se relacionaron directamente con las diferencias en el rendimiento y sus componentes entre las localidades. En suma, entre las localidades se observaron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) en 90 % de las 10 variables del rendimiento evaluadas. Esta variabilidad se explica en parte por el carácter silvestre de las plantas (Peña-Valdivia *et al.*, 2012), la cantidad de plantas por unidad de área (competencia por recursos dependiente de la densidad) y el ambiente, incluidas la temperatura, la disponibilidad de humedad y las características del suelo (Mederos-Ramírez y Ortiz-Pérez, 2021).

Aunque el análisis multivariado de CP mostró que las características de las plantas de la localidad AU traslapó completamente a la localidad SAA y gran parte las de MAG, los componentes del rendimiento definieron a cada localidad y confirmaron la respuesta de C.

*longirostrata* al ambiente de crecimiento. Además, se demostró que esas plantas en los ambientes diferentes pueden producir en promedio de 3054 a 10707 semillas por planta. Por lo que se cuenta con el recurso genético para el cultivo *ex situ* (Capítulo 1).

Debido a que las semillas producidas *in situ* son la base de la permanencia de las poblaciones silvestres, la siguiente hipótesis por comprobar fue que las semillas de *C. longirostrata* de plantas silvestres muestran calidad fisiológica adecuada para producir plantas en ambiente parcialmente controlado, independientemente del sitio de recolecta, de sus calidad física y temperatura ambiente. Esta hipótesis no se rechazó ya que, aunque las características físicas de las semillas difirieron significativamente en sus dimensiones físicas y biomasa entre los sitios de recolecta, las semillas de la localidad AU y MAG presentaron viabilidad de embriones de 85 y 91 % y las de AU 51 %. Además, la viabilidad de los embriones repercutió sólo parcialmente en la germinación total (hasta de 90 %), germinación promedio diaria (hasta de 16 semillas día<sup>-1</sup>) y emergencia de las plántulas (hasta de 55 %) y la latencia de las semillas (cerca de 90 %) se elimina desde 30 hasta 80 % con el incremento de la temperatura de germinación, tratamiento pregerminativo con temperatura de 41 °C y H.R. saturada y escarificación mecánica. Esto demuestra que las semillas de esas poblaciones silvestres son recurso potencial para la producción de plantas de chipilín (Capítulo 2). Además, independientemente de la viabilidad de los embriones y la proporción latente de semillas, la disponibilidad de semilla para el cultivo no está restringida, ya que una planta en su ambiente natural produce miles de semillas (hasta 11 000) (Capítulo 1).

Otro objetivo de esta investigación fue cotejar que las semillas de las plantas silvestres son adecuadas para obtener plantas de *C. longirostrata* en ambiente de cultivo parcialmente controlado y que mediante algunos tratamientos como poda parcial y reguladores exógenos del crecimiento puede incrementarse la producción de follaje. El estudio confirmó que las plantas en cultivo en

invernadero, en Montecillos, Estado de México, desarrollaron follaje (ramas y hojas) sano linealmente durante 45 d de cultivo y después florecieron y la biomasa fresca de las ramas y los foliolos decayó. La 6-bencilaminopurina (BAP) exógena promovió el incremento lineal de ramas (núm. y biomasa), hojas y foliolos (núm., biomasa y área) durante 60 d, y el incremento del follaje fue hasta el triple respecto al testigo en ese periodo. Además, la combinación de la poda+BAP superó parcialmente al tratamiento únicamente con la citocinina, pues las plantas generaron cerca de 50 % más hojas y con foliolos más pesados en 60 días respecto a BAP. La producción de follaje de *C. longirostrata* es posible mediante el cultivo en invernadero y puede triplicarse con BAP exógena y la combinación con poda temprana del tallo favorece aún más esa producción. La hipótesis que establece que las semillas de plantas silvestres pueden utilizarse para el cultivo en invernadero de plantas de Chipilín, con la producción de follaje para consumo, y responden a tratamientos agronómicos para incrementar la producción no se rechaza (Capítulo 3).

Los compuestos producidos en el metabolismo especializado pueden ser frecuentes y abundantes en las plantas silvestres. Una característica del proceso de domesticación es la disminución o eliminación de muchos de esos compuestos, ya que entre ellos hay moléculas tóxicas para los humanos (López-Palacios y Peña-Valdivia *et al.*, 2020). En este sentido, *C. longirostrata* no es excepción; ya que el follaje y el resto de las estructuras de la planta son ricas en compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, cumarinas, taninos, antraquinonas, antronas y alcaloides (Arias *et al.*, 2003; Bibi *et al.*, 2015; Cruz-Rodríguez *et al.*, 2017). Otros compuestos que también son clasificados, por algunos autores, como producto del metabolismo especializado son los polizacáridos estructurales (Erb y Kliebenstein, 2020). El ambiente de crecimiento que genera estrés en las plantas puede activar el metabolismo especializado, con el incremento de la concentración de uno más de esos metabolitos o alteración de sus proporciones en los tejidos. En

este estudio se evaluó la hipótesis de que el cambio del ambiente silvestre al parcialmente controlado del invernadero no genera estrés en las plantas de *C. longirostrata* o no es suficiente para incrementar uno o varios de los grupos de compuestos de ese metabolismo especializado. Por lo que, se evaluó la composición química de folíolos, flores y ramas recolectados de poblaciones silvestres en Las Vigas, Guerrero, México (16° 40' 264" N, 98° 27' 502" O y 264 m s.n.m.) y de plantas cultivadas en invernadero en Montecillo, Texcoco, Estado de México (19° 29' N, 98° 53' O, 2,240 m s.n.m). Las evaluaciones incluyeron, como referencia, algunos compuestos del metabolismo primario, *i.e.*, glucosa, fructosa, sacarosa y almidón y proteína total y la presencia y concentración de algunos grupos del metabolismo especializado, *i.e.*, fenoles, fibra alimentaria, flavonoides, hemicelulosas, taninos, terpenos y saponinas. Además, en ambos grupos de plantas se cuantificó el contenido de minerales. La concentración de glucosa (32 %) y fructosa (11 %) en los folíolos y el de sacarosa de las flores (8 %) de las plantas de invernadero fue significativamente mayor respecto al de las recolectadas *in situ*. Similarmente, la concentración de minerales, fenoles, flavonoides y saponinas fue (29, 15, 47 y 59 %) mayor en los tejidos de las plantas de invernadero. En contraste, la concentración de proteína (15 %), fibra detergente neutro (14 %), hemicelulosas (21 %), taninos (60 %) y terpenos (46 %) de folíolos y flores recolectados *in situ* fue mayor respecto a los del invernadero. Estos resultados indicaron que la composición química de los folíolos y las flores de las plantas de Chipilín se modifica parcialmente con el ambiente de crecimiento; pero, falta comprobar que los cambios están en el intervalo de concentraciones no tóxicas para los humanos (Capítulo 4).

## CONCLUSIONES GENERALES

1. Los componentes del rendimiento y el rendimiento de semilla de poblaciones silvestres de *C. longirostrata* muestran variabilidad genética (biotipos) y especificidad al ambiente de crecimiento. Los biotipos, independientemente del ambiente en el que crecen, producen miles de semillas por planta con potencial de uso para multiplicar las plantas *ex situ*.
2. Los ambientes menos cálidos y los suelos con capacidad de campo y punto de marchitez permanente mayores parecen menos favorables para la producción de semillas. Al contrario, el suelo con mayor capacidad de intercambio catiónico, concentración de materia orgánica, P extraíble y K soluble favorece el desarrollo de las plantas de *C. longirostrata*, que resulta en alto rendimiento de semilla, en el ambiente silvestre.
3. Ya que, actualmente la información del rendimiento y sus componentes del germoplasma de *C. longirostrata* es escasa, los resultados de este estudio son la información más completa con la que se cuenta y representa una base para la producción agrícola de esta especie.
4. Las semillas de *C. longirostrata* de tres localidades que contrastan parcialmente en ambiente de crecimiento difieren parcialmente en sus características físicas, viabilidad y vigor, pero pueden germinar hasta en 99 %, con tratamientos pregerminativos como esscarificación mecánica y calor húmedo.
5. La temperatura óptima para la germinación de las semillas de *C. longirostrata* es entre 35 y 40 °C; temperaturas menores inhiben parcialmente la germinación de las semillas no latentes y la inhibición es total a 45 °C.

6. La emergencia de las plántulas de esta especie puede ser entre 30 y 60 % con semillas escarificadas, en dependencia de la localidad de origen; y la producción de miles de semillas por planta asegura el recurso para el manejo *ex situ*.
7. La producción de follaje de *C. longirostrata* es posible mediante el cultivo en invernadero y puede triplicarse con BAP exógena y la combinación con poda temprana del tallo favorece aún más esa producción.
8. La composición química de los folíolos, ramas y las flores de las plantas de *C. longirostrata* se modifica parcialmente con el ambiente de crecimiento.
9. Los folíolos y las flores de *C. longirostrata* pueden ser suplementos alimenticios por su contenido de proteína y minerales, así como la presencia de compuestos fenólicos y terpenos.

## LITERATURA CITADA

- Agarwal A., Singh H. P., Rai, J. P. N. 2014. Chromium phytoextraction from tannery effluent-contaminated soil by *Crotalaria juncea* infested with *Pseudomonas fluorescens*. *Environmental Science and Pollution Research* 21(13): 7938-7944.
- Ahmed Z. S., Nowrin T., Hossain M. H., Nasrin T., Akter R. 2018. Metabolite profiling of *Crotalaria verrucosa* leaf extract and evaluation of its antioxidant and cytotoxic potency. *Research Journal of Phytochemistry* 12(2): 60-70.
- Alcorn P., Forrester D., Thomas D., James R., Smith R., Nicotra A., Bauhus, J. 2013. Changes in whole-tree water use following live-crown pruning in young plantation-grown *Eucalyptus pilularis* and *Eucalyptus cloeziana*. *Forests* 4(1): 106-121.
- Alerding A. B., Waalkes M. R., Hill E. S., Rowe R. A., Parsons G. 2018. Stem growth during seed production in soybean: Implications for pod yield. *Journal of Crop Improvement* 32(2): 156-174. <https://doi.org/10.1080/15427528.2017.1381866>
- Almeida-Santos L. E., Obrador-Olán J. J., García-López E., Castelán-Estrada M., Carrillo-Ávila E. 2019. Cultivo e incorporación de *Crotalaria juncea* L. en un suelo cañero de la Chontalpa, Tabasco, México. *Agroproductividad* 12(7): 87-93.
- Amabile R. F., Fancelli A. L., Carvalho A. M. D. 2000. Evaluation of green manures in different sowing dates and row-spacings in the Cerrados region. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35(1): 47-54.
- AOAC, Official Methods of Analysis. Association of Analytical Chemists 2005. 18th Ed. Washington, DC, USA. 128p.
- Araujo A. V. D., Araujo E. F., Amaro H. T. R., Santos R. H. S., Cecon P. R. 2018. Time of harvest and storability of *Crotalaria juncea* L. seeds. *Revista Ciência Agronômica* 49: 103-111.
- Arellano J. 1985. Etnobotánica de Leguminosas: Notas sobre algunas de las especies utilizadas en la alimentación en México. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica* 57: 123-142.
- Arias L., Losada H., Rendon A., Grande D., Vieyra J., Soriano R., Rivera J., Cortes J. 2003. Evaluation of chipilin (*Crotalaria longirostrata*) as a forage resource for ruminant feeding in the tropical areas of Mexico. *Livestock Research for Rural Development* 15(1): 1-4.
- Asres K., Sporer F., Wink, M. 2004. Patterns of pyrrolizidine alkaloids in 12 Ethiopian *Crotalaria* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 32(10): 915-30.
- Astiasarán Anchía I., Martínez Hernández J. A., Muñoz Hornillos M. 2007. Claves para una alimentación óptima: qué nos aportan los alimentos y cómo utilizarlos a lo largo de la vida. Ediciones Díaz de Santos.

- Ayala-Cordero G., Terrazas T., López Mata L., Trejo C. 2004. Variación en el tamaño y peso de la semilla y su relación con la germinación en una población de *Stenocereus beneckeii*. *Interciencia* 29 (12): 692-697.
- Ayala-Herrada L., Cruz M. V., Lopez B. P., Ledezma J. A., Sevilla H. M. 2010. Escarificación de semillas de *Indigofera hirsuta* (Linneaus), *Canavalia maritima* (Thouars) y *Crotalaria longirostrata* (Hook). *Revista de la Facultad de Agronomía* 27(3): 433-446.
- Azcón-Bieto J. A., Talón M. 2013. *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill Interamericana.
- Azurdia C. 2016. *Plantas Mesoamericanas Subutilizadas en la Alimentación Humana. El caso de Guatemala: una revisión del pasado hacia una solución actual*. Consejo Nacional de Áreas Protegidas y Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación. Documento técnico No. 11-2016.
- Bacete L, Hamann T. 2020. The role of mechanoperception in plant cell wall integrity maintenance. *Plants (Basel)* 9(5): 1-18.
- Barbier F. F., Dun E. A., Kerr S. C., Chabikwa T. G., Beveridge C. A. 2019. An update on the signals controlling shoot branching. *Trends in Plant Science* 24(3): 220-236.
- Barbier F. F, Dun E. A., Beveridge C. A. 2017. Dominancia apical. *Biología Actual* 27(17): R864-R865.
- Baskin C. C., Baskin J. M. 2014. Germination ecology of seeds with nondeep physiological dormancy. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Elsevier, 2nd ed. Chapter 4. 79-117. <https://www.sciencedirect.com/book/9780124166776/seeds#book-info>.
- Baskin C. C., Baskin, J. M. 1998. *Seeds: ecology, biogeography, and, evolution of dormancy and germination*. Elsevier.
- Baskin J. M., Baskin C. C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14(1): 1-16.
- Basurto P. F., Martínez A. M. A., Villalobos C.G. 1998. Los quelites de la Sierra Norte de Puebla, México: inventario y formas de preparación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 62: 49-62.
- Basurto-Peña F. 2011. Los quelites de México: especies de uso actual. En: Mera L. M., Castro, L.D., Bye R., eds. *Especies vegetales poco valoradas: una alternativa para la seguridad alimentaria*. Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 32-41.
- Beltramini V. S., Pascualides, A. L. 2017. Efecto del color de la cubierta seminal sobre la imbibición, la germinación y la estructura de la semilla de *Crotalaria juncea* (Fabaceae). *Lilloa* 54 (2): 101-109.

- Benedetto A. D., Galmarini C., Tognetti J. 2013. Changes in leaf size and in the rate of leaf production contribute to cytokinin-mediated growth promotion in *Epipremnum aureum* L. cuttings. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 88(2): 179-186.
- Benedetto A. D., Galmarini C., Tognetti J. 2015. Effects of combined or single exogenous auxin and/or cytokinin applications on growth and leaf area development in *Epipremnum aureum*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 90(6): 643-654.
- Bernal H. Y. 1986. Taxonomía numérica en un género de Angiospermas. Delimitación de especies en *Crotalaria* (Fabaceae-Faboideae). *Perez-Arbelaezia* 1(3): 257-309. <https://perezarbelaezia.jbb.gov.co/index.php/pa/article/view/36>.
- Bernal L., Coello P., Martínez-Barajas E. 2005. Possible role played by R1 protein in starch accumulation in bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings under phosphate deficiency. *Journal of Plant Physiology* 162: 970–976.
- Bewley J. D., Black M. 2012. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. In: Viability, dormancy, and environmental control. Vol 2. Springer Science & Business Media, Berlin
- Bewley J. D., Bradford K. J., Hilhorst H. W. M., Nonogaki H. 2013. Seeds: physiology of development, germination and dormancy, Chapter 4. 3rd edition. Springer, New York, pp. 133-175.
- Bibi Y., Arshad M., Ahmad N., Riaz I., Chaudhari S. K. 2015. An insight into medicinal and ethnopharmacological potential of *Crotalaria burhia*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 5(7): 511-514. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60826-X](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60826-X)
- Bieżanowska-Kopeć R., Ambroszczyk A. M., Piątkowska E., Leszczyńska T. 2022. Nutritional value and antioxidant activity of fresh pumpkin flowers (*Cucurbita* sp.) grown in Poland. *Applied Sciences* 12(13): 6673.
- Bishop G.J., Sakakibara H., Seo M., Yamaguchi S. 2015. Biosynthesis of Hormones. In Buchanan B. B., Jones R. L., Gruissem W. *Biochemistry and molecular biology of plants*. First edition. American Society of Plant Biologists. Wiley, New York, pp. 769-832.
- Boehlein S. K., Shaw J. R., Boehlein T. J., Boehlein E. C., Hannah L. C. 2018. Fundamental differences in starch synthesis in the maize leaf, embryo, ovary and endosperm. *The Plant Journal* 96:595-606, <https://doi.org/10.1111/tpj.14053>.
- Boisson S., Le Stradic S., Commans M., Dumont A., Leclerc N., Thomas C., Mahy G. 2016. Copper tolerance of three *Crotalaria* species from southeastern DR Congo at the early development stage. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 20(2): 151-160.
- Bradshaw A. D. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics* 13: 115-155.
- Bye R. 1981. Quelites-ethnobiology of edible green-past, present and future. *Journal of Ethnobiology* 1: 109-123.

- Bye R., Linares E. 2000. Los quelites, plantas comestibles de México una reflexión sobre intercambio cultural. *Biodiversitas* 31:11 -14.
- Caballero R. A. 2013. Hojas verdes: alimentos saludables. Opciones prácticas para su consumo. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas: UNICACH. 77 pp.
- Cáceres A., Martínez-Arévalo V., Mérida-Reyes M. S., Sacbajá A., López A., Cruz S. M. 2019. Contenido de oligoelementos y factores antinutricionales de hojas comestibles nativas de Mesoamérica. *Ciencia, Tecnología y Salud* 6(2): 132-148.
- Cadena-Iñiguez P., De la Cruz-Morales F. R. 2012. Comidas y bebidas: mezcla de saberes y sabores zoques en Chiapas. *Agroproductividad* 5(4): 18-26.
- Camarillo-Castillo F., Mangan F. X. 2020. Biological nitrogen fixation in chipilin (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.), a sustainable nitrogen source for commercial production. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 26(2): 125-141.
- Cardoso P. F., Gratão P. L., Gomes-Junior R. A., Medici L. O., Azevedo R. A. 2005. Response of *Crotalaria juncea* to nickel exposure. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17(2): 267-272.
- Carnelos D., Lozano-Miglioli J., Giardina E., Tognetti J., Benedetto A. H. D. 2022. Cytokinin action revisited: leaf anatomical changes play a key role in 6-benzylaminopurine-driven growth promotion in pot-grown lettuce. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 28(2): 109-133.
- Castiñeiras A., Fundora M., Shagarodsky S., Fuentes F., Barrios G., Moreno F.V., Sánchez P., González A. A., Martínez F. A., García G. M., Martínez R. A. 2000. La conservación *in situ* de la variabilidad de plantas de cultivo en dos localidades de Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional* 21(1): 25-45. <https://doi.org/doi.org/10.5154/r.rchsh.2020.01.002>
- Castro-Lara D., Bye-Bottler R., Basurto-Peña F., Mera-Ovando L. M., Rodríguez-Servín, J., Álvarez-Vega J., Morales de León J., Caballero-Roque A. 2014. Revalorización, conservación y promoción de quelites. Una tarea conjunta. *Agroproductividad* 7: 8-12.
- Celis-Velázquez R., Peña-Valdivia C. B., Luna C. M., Aguirre R. J. R., Carballo A., Trejo C. 2008 a. Variabilidad morfológica seminal y del vigor inicial de germoplasma mejorado de frijol. *Agronomía Mesoamericana* 19(2): 179-193.
- Celis-Velázquez R., Peña-Valdivia C. B., Trejo-López C., Aguirre J. R., Córdoba-Téllez L., Carballo-Carballo A. 2008 b. Consumo de reservas de la semilla de frijol para la emergencia y desarrollo inicial en diferentes profundidades de siembra. *Agronomía Mesoamericana* 19(2): 167-177.
- Centurión H. D., Espinosa M. J., Poot M. J. E., Cázares C. J. G. 2003. Cultura alimentaria tradicional de la región Sierra de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Chang C., Yang M., Wen H., Chern J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.

- Chávez E., Roldán T. J., Sotelo O., B., Ballinas D., López Z. 2009. Plantas comestibles no convencionales en Chiapas, México. *Revista Salud Pública y Nutrición* 10(1): 1-10.
- Cho L. H., Yoon J., Tun W., Baek G., Peng X., Hong W. J., Mori I. C., Joo Y., Matsuura T., Kim S. R., Kim S. T., Kwon S. W., Jung K. H., Jeon J. S., An G. 2022. Cytokinin increases vegetative growth period by suppressing florigen expression in rice and maize. *The Plant Journal* 110(6): 1619-1635.
- Colinas M., T. B. Fitzpatrick. 2022. Coenzymes and the primary and specialized metabolism interface. *Current Opinion in Plant Biology* 66: 102170
- CONAGUA, 2021. Gobierno de México, Información del clima 1981-2010 de Guerrero. <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/informacionclimatologica/normalesclimatologicas-por-estado?estado=gro>
- Copeland L. O., McDonald M. B. 2001. *Principles of Seed Science and Technology*. Fourth edition. Kluwer Academic Publishers. Norwell, Massachusetts. 488p. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcf127>
- Cordero Y., Briceño Z., Ascencio J. 2005. Respuestas fisiológicas de *Crotalaria spectabilis* Roth cultivada en solución nutritiva deficiente y suficiente en fósforo. *Anales de Botánica Agrícola* 12: 19-30.
- Cruells M. G. 2004. La montaña de humo: tesoros zoques de Chiapas. Unam. 101 p.
- Crusciol C. A. C., Soratto R. P. 2009. Nitrogen supply for cover crops and effects on peanut grown in succession under no-till system. *Agronomy Journal* 101: 40-46.
- Cruz-Campos J. M., Medina-Arce J. L., Larqué-Saavedra, F. A. 2012. Efecto de aspersiones del dimetilsulfóxido en la productividad del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(4): 785-788.
- Cruz-Rodríguez R. I., Cruz S. A., Ruiz L. N., Pérez V. J. I., Esquinca A. H. A., Meza G. R. 2020. Potential application of *Crotalaria longirostrata* branch extract to reduce the severity of disease caused by *Fusarium*. *Agronomy* 10: 1-11.
- Cruz-Rodríguez R. I., Cruz-Salomón A., Ruiz-Lau N., Pérez-Villatoro J. I., Esquinca-Avilés H. A., Meza-Gordillo R. 2020. Potential application of *Crotalaria longirostrata* branch extract to reduce the severity of disease caused by *Fusarium*. *Agronomy* 10(4): 524. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040524>.
- Cruz-Rodríguez R. I., Meza-Gordillo R., Rodríguez-Mendiola M. A., Arias-Castro C., Mancilla-Margalli N. A., Ávila-Miranda M. E., Culebro-Ricaldi J. M., Gutiérrez-Miceli F. A., Ruiz-Valdiviezo V. M., Ayora-Talavera T. D. R. 2017. Antifungal activity of *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. extracts against phytopathogen fungi from maize. *Gayana Botánica* 74(1): 167-175. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432017005000102>.

- Da Silva N. A., Lourenção A. L. F., Pezarico C. R., Scalón S. D. P. Q., Gonçalves M. C. 2009. Fontes e níveis de salinidade na germinação de sementes de *Crotalaria juncea* L. *Ciência e Agrotecnologia* 33(3): 753-757.
- Davies P. J. 2010. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: Davies P.J. (eds) *Plant Hormones*. Springer, Dordrecht. 830 p. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_1).
- Delouche J. C., Baskin C. C. 1973. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Science and Technology* 1: 427-452.
- Desaeger J., Rao M. 2000. Parasitic nematode populations in natural fallows and improved cover crops and their effects on subsequent crops in Kenya. *Field Crops Research* 65(1): 41-56. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00071-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00071-4)
- Desaeger J., Rao M. R. 1999. The root-knot nematode problem in sesbania fallows and scope for managing it in western Kenya. *Agroforestry Systems* 47: 273-288.
- Devendra B. N., Srinivas N., Solmon K. S. 2012. A comparative pharmacological and phytochemical analysis of in vivo & in vitro propagated *Crotalaria* species. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 5(1): 37-41. [https://doi.org/10.1016/S199-57645\(11\)60242-3](https://doi.org/10.1016/S199-57645(11)60242-3)
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., González L., Tablada M., Robledo C. W. 2008. *InfoStat*, versión 2008. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 336 p.
- Duke J. A. 1983 *Crotalaria juncea* L. Manual de cultivos energéticos. Disponible en [http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/Crotalaria\\_juncea.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Crotalaria_juncea.html) (Consulta: 29.09.2019).
- Duke J. A., Atchley A. A. 1986. *Handbook of proximate analysis tables of higher plants*. Boca Raton, US CRC Press. Reissued 2018 by CRC press. 398 p.
- Ek-Chulim A. R., Ventura-Canseco L. M. C., Álvarez-Gutiérrez P. E., Gutiérrez-Miceli F. A., Abud-Archila M. 2018. Pan vegano adicionado con *Lactobacillus plantarum* Bal-03-ittg y harina de *Crotalaria longirostrata*, *Cnidisculus aconitifolius* y *Moringa oleifera*. *Agroproductividad* 11(7): 121-127.
- El-Mesirry D., Radi, H. M. 2019. Effect of Clove Diameter and Plant Growth Regulators on Growth and Yield of Balady Garlic (*Allium sativum* L.). *Alexandria Science Exchange Journal* 40: 599-603.
- Erb M., D. J. Kliebenstein. 2020. Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. *Plant Physiology* 184: 39 –52.
- Escalante-Estrada J. A. S., Rodríguez-González M. T., Escalante-Estrada Y. I. 2015. Acumulación y distribución de materia seca en cultivares de maíz asociados con frijol en clima templado. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 12:139-143.

- Essiett U. A., Bala D. N., Agbakahi J. A. 2010. Pharmacognostic studies of the leaves and stem of *Diodia scandens* SW in Nigeria. *Archives of Applied Science Research* 2(5): 124-198.
- Eyles A., Barry K. M., Quentin A., Pinkard E. A. 2013. Impact of defoliation in temperate eucalypt plantations: Physiological perspectives and management implications. *Forest Ecology and Management* 304: 49-64.
- Fan J. P., He C. H. 2006. Simultaneous quantification of three major bioactive triterpene acids in the leaves of *Diospyros kaki* by high-performance liquid chromatography method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41(3): 950-956. Doi: [10.1016/j.jpba.2006.01.044](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.01.044).
- Fang X., Yang C., Wei Y., Ma Q., Yang L., Chen X. 2011. Genomics grand for diversified plant secondary metabolites. *Plant Diversity and Resources* 33(1): 3-64.
- FAO and Alliance of Bioversity International and CIAT. 2021. Insights on sustainability and resilience from the front line of climate change Indigenous Peoples' food systems. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb5131>
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. Salud, saberes y sabores: México, Sopa de bolitas de masa con chipilín.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. Salud, saberes y sabores: Recuperando el conocimiento culinario tradicional de las mujeres de América Latina y el Caribe para el manejo y enriquecimiento de la biodiversidad alimentaria. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/I8269ES/> (consulta: abril de 2018).
- FAO. 1993. Cultivos andinos: Valor nutritivo y usos en la alimentación humana de algunos cultivos autóctonos subexplotados de Mesoamérica. Capítulo II: Hortalizas, Leguminosae, *Crotalaria longirostrata*. <http://www.rlc.fao.org> (Consulta: abril de 2018).
- Fazelzadeh S., Habibi A. B., Karimaneh Z. 2013. Optimization of callus induction and seedling regeneration in asparagus (*Asparagus officinalis*). *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Science* 2(1): 5-8.
- Ferrarotto S. M. S., Otaiza Y. 2014. Evaluación de la morfología cuantitativa y capacidad de penetración de raíces de *Crotalaria (crotalaria juncea* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.). *Pittieria* 38: 105-119.
- Fischler M., Wortmann C. S. 1999. Green manures for maize-bean systems in Eastern Uganda: Agronomic performance and farmers' perceptions. *Agroforestry Systems* 47(1): 123-138. <https://doi.org/10.1023/A:1006234523163>
- Flores A. S., Goulart A. T. A. M., Trigo J. R. 2009. Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: Chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology* 37(4): 459-469.
- Forbis T. A., Floyd S. K., Queiroz, A. 2002. The evolution of embryo size in angiosperms and other seed plants: implications for the evolution of seed dormancy. *Evolution* 56(11): 2112-2125.

- Gall H. L., Philippe F., Domon J-M., Gillet F., Pelloux J., Rayon C. 2015. Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants* 4(1): 112-166.
- Gámez C. F. J., Bañuelos T. O., Perdomo R. F., Vázquez S. J. M., Trujillo C. A. 2019. La *Crotalaria juncea* L. una alternativa forrajera para la ganadería en el trópico mexicano. VI Tropical Livestock World Congress. Session 2. Nutrition and fodder, 24-26 pp.
- García C. B., González C. S., Rodríguez M. 2011. Evaluación de coberturas de suelo con caléndula (*Calendula officinalis* L.), *Crotalaria* (*Crotalaria* Sp. L.) y avena (*Avena* Sp. L.) En el control de *Meloidogyne* Spp. En lulo (*Solanum quitoense* Lam.). *Revista de Ciencias Agrícolas* 28(2): 43-57.
- García E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Garduza-Acosta B., Lagunes-Espinoza L.C., Bautista-Muñoz C.C., García-de-Los-Santos G., Zaldívar-Cruz, J.M., Hernández-Flores A. 2020. Germination of *Crotalaria* and *Lupinus* (Fabaceae) seeds submitted to different pre-germination treatments and their effect on enzymatic activity during early germination. *Brazilian Journal of Biology* 80(1): 23-29.
- Ghanimi R., Ouhammou A., Baazizi H., Houguig K., Cherkaoui, M. 2022. Nutritional value of six wild edible plants traditionally used as vegetables in Morocco. *Ecology, Environment and Conservation* 28(2): 1000-1004.
- Ghosh D. 2015. Tannins from foods to combat diseases. *International Journal of Pharma Research & Review* 4(5): 40-44.
- Ghosh P., Rana S. S. 2021. Physicochemical, nutritional, bioactive compounds and fatty acid profiling of pumpkin flower (*Cucurbita maxima*), as a potential functional food. *SN Applied Sciences* 3(2): 1-14.
- Glanz-Idan N., Tarkowski P., Turečková V., Wolf S. 2020. Root–shoot communication in tomato plants: cytokinin as a signal molecule modulating leaf photosynthetic activity. *Journal of Experimental Botany* 71(1): 247-257.
- González Y., Reino J., Toral O. 2011. Calidad de las semillas de accesiones de leguminosas colectadas en la región oriental de Cuba (Nota técnica). *Pastos y Forrajes* 34(1): 29-35.
- González Y., Sánchez J. A., Reino J., Muñoz B., Montejo L. 2008. Efectos combinados de escarificación y de hidratación parcial en la germinación de semillas frescas de leguminosas. *Pastos y Forrajes* 31(4): 1-1.
- Gratani L. 2014. Plant phenotypic plasticity in response to environmental factors. *Advances in Botany* 2014: 1-17.
- Guamán-Díaz F., Torres-Gutiérrez R., Granda-Mora K., Nápoles-García M. C. 2016. Aislamiento y caracterización de rizobios de *Crotalaria* sp. En el sur de Ecuador. *Cultivos Tropicales* 37(1): 40-47.

- Guerra J. G., Rodríguez L N., Andino R.V., Hernández G. B. 2000. Influencia de la distancia entre plantas y la altura de desbotonado en algunos indicadores económicos de la variedad "Habana 2000" cultivado bajo tela. *Avances* 2:1-5.
- Guerra-Centeno D., Valdez-Sandoval J., Villatoro F., Rodenas M., Fuentes-Rousselin H., Díaz M., Ríos L. 2016. Crecimiento de la cría de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) utilizando hojas de chipilín (*Crotalaria longirostrata*) como sustituto parcial del alimento balanceado. *Revista Electrónica de Veterinaria* 17(10): 1-12.
- Guerrero G. A. 1999. Cultivos herbáceos extensivos. Editorial Mundi-Prensa.
- Gurvich D.E., Pérez-Sánchez R., Bauk K., Jurado E., Ferrero M. C., Funes G., Flores J. 2017. Combined effect of water potential and temperature on seed germination and seedling development of cacti from a mesic Argentine ecosystem. *Flora* 227: 18–24.
- Gutiérrez-Rodríguez M. G., Chávez R. S. M., Cortés P. A., Larqué S.A. 2003. Efecto del dimetilsulfóxido en el peso fresco de rábano y betabel. *Agrociencia* 37(3): 237-240.
- Hall A. 1980. Los componentes fisiológicos del rendimiento de los cultivos. *Revista de La Facultad de Agronomía* 1(1): 73-86.
- Hamann T., Bennett M., Mansfield J., Somerville C. 2009. Identification of cell-wall stress as a hexose-dependent and osmosensitive regulator of plant responses. *The Plant Journal* 57: 1015-1026.
- Hernández S. E., García-Martínez, I. 2016. Brasinoesteroides en la agricultura. I. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(2): 441-450.
- Hiai S., Oura H., Nakajima T. 1976. Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Medica* 29(2): 116-122. doi: 10.1055/s-0028-1097639.
- Huerta-Lovera M., Peña-Valdivia C. B., García-Esteva A., Kohashi-Shibata J., CamposGarcía H., Aguirre-Rivera J. R. 2018. Maguey (*Agave salmiana*) infructescence morphology and its relationship to yield components. *Genetic Resources and Crop Evolution* 65(69): 1649-1661.
- Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). 2012. Tabla de composición de alimentos de Centroamérica. M.T. Menchú & H. Méndez (eds.). 2edición. Serviprensa, Guatemala, 137p.
- International Seed Testing Association (ISTA). 2005. International Rules for Seed Testing, International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.
- ISTA, International Seed Testing Association. 2018. International Rules for Seed Testing, International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.
- IUSS Working Group WRB. 2015. World reference base for 2014, update 2015 international soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World soil resources reports No. 106. FAO, Rome.

- Jacobi C. M., Ramalho M., Silva M. 2005. Pollination biology of the exotic rattleweed *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae) in NE Brazil. *Biotropica: The Journal of Biology and Conservation* 37(3): 357-363. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2005.00047.x>
- Jaimes L. J., Giraldo A. M., Correa H. J. 2019. ¿De qué está hecha la fibra en detergente ácido (FDA)? *Livestock Research for Rural Development* 31 (3): 1-25.
- Janečková H., Husičková A., Lazár D., Ferretti U., Pospíšil P., Špundová M. 2019. Exogenous application of cytokinin during dark senescence eliminates the acceleration of photosystem II impairment caused by chlorophyll b deficiency in barley. *Plant Physiology and Biochemistry* 136(1): 43-51.
- Jiménez S. A., Farfán V., Morales L. C. 2005. Biomasa seca y contenido de nutrientes de *Cajanus cajan*, *Crotalaria juncea* y *Tephrosia candida*, empleadas como abonos verdes en cafetales. *Cenicafé* 56(2): 93-109.
- Jiménez-Aguilar D. M., Grusak M. A. 2015. Evaluation of minerals, phytochemical compounds and antioxidant activity of Mexican, Central American, and African green leafy vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition* 70(4): 357-364.
- Jin S., Wang Y., Shi L., Guo X., Zhang J. 2018. Effects of pruning and mulching measures on annual soil moisture, yield, and water use efficiency in jujube (*Ziziphus jujube* Mill.) plantations. *Global Ecology and Conservation* 15: 1-14, e00406.
- Kan L., Nie S., Hu J., Wang S., Bai Z., Bai Z., Wang J., Zhou Y., Jiang J., Zeng Q., Song K. 2018. Comparative study on the chemical composition, anthocyanins, tocopherols and carotenoids of selected legumes. *Food Chemistry* 260: 317-326.
- Khan N. A., Ahsan N. 2000. Evaluation of yield potential of defoliated mustard cultivars. *Tests of Agrochemicals and Cultivars* (21): 33-34. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013124406>
- Khan N. A., Singh S., Nazar R., Lone P. M. 2007. The source-sink relationship in mustard. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology* 1(1): 10-18.
- Kiruthiga R., Rakkimuthu R., Aravinthan K. M. 2014. Antibacterial activity of *Crotalaria pallida* Aiton. (Fabaceae). *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research* 2(1): 82-85.
- Kumar A., Mirza A., Davinder B. S., Pratap S., Singh R. 2017. Effect of pruning, micronutrients and plant growth regulators on *Kinnow Mandarin* fruits. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 11(2): 1169-1174.
- Kumar G. G., Gali V., Dwiwedi S. C. 2011. Phytochemical investigation of *Crotalaria burhia* Hamilt. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2(4): 1721-1724.
- Kumar V., Khare T., Arya S., Shriram V., Wani S. H. 2017. Effects of toxic gases, ozone, carbon dioxide, and wastes on plant secondary metabolism. In *Medicinal plants and environmental challenges*, Springer, Cham, pp. 81-96.

- Laguna G, J. 2016. Determinación de la actividad biológica y caracterización de extractos del chipilín (*Crotalaria longirostrata*) con potencial aplicación en alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Lamers J., van der Meer T., Testerink C. 2020. How plants sense and respond to stressful environments. *Plant Physiology* 182: 1624-1635.
- Lamichaney A, A Maity. 2021. Implications of rising atmospheric carbon dioxide concentration on seed quality. *International Journal of Biometeorology* 65: 805-812.
- Lara D. C., Peña F. B., Mera O. L. M., Bye B. R. A. B. 2011. Los quelites, tradición milenaria en México. Universidad Autónoma Chapingo. 41 pp.
- Lazzarini L.E.S., Bertolucci S.K.V., de Carvalho A.A., Santiago A.C., Pacheco F.V., Célio-Ferreira M.M., Pereira-Pinto J.E.B. 2019. Growth regulators affect the dry weight production, carvacrol and thymol content of *Lippia gracilis* Schauer. *Industrial Crops and Products* 129: 35-44.
- Ledesma S. J. A., Chávez V. A., Pérez-Gil F., Mendoza M. E., Calvo C. C. 2010. Composición de alimentos Miriam Muñoz de Chávez. Valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo. McGraw Hill. México. 364 pp.
- Leishman M. R., Wright I. J., Moles A. T., Westoby M. 2000. The evolutionary ecology of seed size. In: *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. (Ed.) Michael, Fenner. 2nd edition. CAB International, Redwood Press, Melksham. 31-57 pp.
- Lewis G. P., Schrire B. D., Mackinder B. A., Rico L., Clark R. 2013. A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context-a tool for collections management and taxon sampling. *South African Journal of Botany* 89(1): 76-84.
- Li Y., Kong D., Fu Y., Sussman M. R., Wu H. 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 148: 80-89.
- Linares M. E., Bye B. R. 2015. Las especies subutilizadas de la milpa. *Revista Digital Universitaria* 16(5): 1-22. <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num5/art35/>
- Liyana-Pathirana C. M., Shahidi F. 2006 Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(4): 1256-1264.
- López-López H., Beltrán-Beache M., Ochoa-Fuentes Y. M., Castro del Ángel E., Cerna Chávez E., Delgado-Ortiz J. C. 2022. Extracto metanólico de *Crotalaria longirostrata*: Identificación de metabolitos secundarios y su efecto insecticida. *Scientia Agropecuaria* 13(1): 71-78.
- López-Palacios C., Peña-Valdivia C. B. 2020. Screening of secondary metabolites in cladodes to further decode the domestication process in the genus *Opuntia* (Cactaceae). *Planta* 251(4): 1-14.

- LPWG, Legume Phylogeny Working Group. 2013. Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon* 62(2): 217-248. <https://doi.org/10.12705/622.8>.
- Macías L. D. R. Q. 2017. *El Códice In'lakesh: Los Veintiún Pergaminos*. Balboa Press. 436 pp.
- Magaña-Valenzuela W., Obrador-Olán J. J., García-López E., Castelán-Estrada M., Carrillo -Ávila E. 2020. Rendimiento comparativo de la yuca bajo fertilización mineral y abono verde. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11(6): 1259-1271.
- Makkar H. P. S., Norvsambuu T., Lkhagvatseren S., Becker K. 2009. Plant secondary metabolites in some medicinal plants of Mongolia used for enhancing animal health and production. *Tropicultura* 27: 159-167.
- Mangan F., Barros Z., Fernandes C., Moreira M., Finger F., Almeida G. 2010. Developing sustainable production practices for new tropical vegetables for the Northeastern United States. *Acta Horticulturae* 936(1): 53-60.
- Martínez, C. T. 2016. Evaluación de cinco fuentes alimenticias en la reproducción de caracoles de agua dulce (*Pomacea flagellata*). Universidad de El Salvador.
- Martínez-Moreno D., Núñez-Farfán J., Terrazas T., Lucero del Mar R. P., Trinidad-Santos A., Trejo-López C., Larque-Saavedra A. 1999. Plastic responses to clipping in two species of *Amaranthus* from the Sierra Norte de Puebla, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46(3): 225-234.
- Mateos-Maces L., Chávez-Servia J. L., Vera-Guzmán A. M., Aquino-Bolaños E. N., Alba-Jiménez J. E., Villagómez-González B. B. 2020. Edible leafy plants from Mexico as sources of antioxidant compounds, and their nutritional, nutraceutical and antimicrobial potential: A review. *Antioxidants* 9(541): 1-24.
- Maurer A.R., Ormrod D.P., Adedipe N.O. 1969. Yield Response of Peas to Foliar Application of Dimethyl Sulfoxide and Cycocell. *HortScience* 4(4): 301-302.
- McClung de Tapia E., Martínez Y. D., Ibarra M. E., Adriano M. C. 2014. Los orígenes prehispánicos de una tradición alimentaria en la cuenca de México. *Anales de Antropología* 48(1): 97-121.
- Meagher J. R., Watrous K., Fleischer S., Nagoshi R., Brown J., Miller N., Hight S., Legaspi J., Westbrook J. 2019. Documenting potential sunnhemp (*Crotalaria juncea* L.) (Fabaceae) pollinators in Florida. *Environmental Entomology* 48(1): 343-359. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/ee/nvy190>
- Mederos-Ramírez A., Ortiz-Pérez R. 2021. Analysis of the genotype environment interaction in the of soybean crop (*Glycine max* (L) Merrill). *Cultivos Tropicales* 42(1): 1-10.
- Menchú M. T., Méndez H. 2012. *Tabla de Composición de Alimentos de Centroamérica (3ªed)*. Guatemala: INCAP/OPS. 128pp.

- Miranda-Granados J., Chacón C., Ruiz-Lau N., Vargas-Díaz M., Zepeda L., Alvarez-Gutiérrez P., Meza-Gordillo R., Lagunas-Rivera S. 2018. Alternative Use of Extracts of Chipilín Leaves (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn) as Antimicrobial. Sustainability 10(8833): 1-7. <https://doi.org/10.3390/su10030883>
- Molinari J., Fujinuma P., Pagani A., Buyatti M., Giardina E., Di Benedetto A. 2019. Impatiens ‘New Guinea’ (*Impatiens hawkeri* Bull) Hormonal Effects during the Post-transplant Biomass Accumulation. Journal of Advances in Agriculture 10: 1629-1649.
- Morales de León J. C., Bourges-Rodríguez H., Camacho-Parra M. E. 2016. Tablas de Composición de Alimentos y Productos Alimenticios Mexicanos (Versión Condesada 2015). Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México.
- Morton J. F. 1994. Pito (*Erythrina berteroana*) and chipilin (*Crotalaria longirostrata*), (fabaceae) two soporific vegetables of Central America. Economic Botany 48(2): 130-138. <https://doi.org/10.1007/BF02908199>
- Mrázková M., Sumczynski D., Orsavová J. 2021. Non-Traditional Muesli Mixtures Supplemented by Edible Flowers: Analysis of Nutritional Composition, Phenolic acids, Flavonoids and Anthocyanins. Plant Foods for Human Nutrition 76(3): 371-376.
- Müller D., Leyser, O. 2011. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. Annals of Botany 107(7): 1203-1212.
- Muñoz M., Ledesma J. A., Chávez A., Pérez F., Mendoza E., Calvo C. 2010. Composición de alimentos. Valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo. Ciudad de México: McGraw Hill Interamericana, segunda edición. 365p.
- Mwakha F. A., Gichimu B. M., Neondo J. O., Kamau P. K. 2020. Agro-morphological characterization of Kenyan slender leaf (*Crotalaria brevidens* and *C. ochroleuca*) accessions. International Journal of Agronomy, 2020:1-10. <https://doi.org/10.1155/2020/2710907>
- Mzoughi Z., Chahdoura H., Chakroun Y., Cámara M., Fernández-Ruiz V., Morales P., Mosbah H., Flamini G., Majdoub H. 2019. Wild edible Swiss chard leaves (*Beta vulgaris* L. var. cicla): Nutritional, phytochemical composition and biological activities. Food Research International 119: 612-621.
- Nakada-Freitas G.P., Inácio-Cardoso A.I., Barbosa-Tavares A.E., Rodrigues- Claudio M.T., Oliveira-Magro F., Lima-Lanna N.B., Lima-Silva P.N., Bardivieso E.M., Magalhães de Souza V.M. 2019. Apical pruning of cucumber has little effect on plant development and seed yield and quality. International Journal of Vegetable Science 26(2): 109-115.
- Navarro-Flores M. J., Ventura-Canseco L. M. C., Meza-Gordillo R., Ayora-Talavera T. D. R., Abud-Archila M. 2020. Spray drying encapsulation of a native plant extract rich in phenolic compounds with combinations of maltodextrin and non-conventional wall materials. Journal of Food Science and Technology 57(11): 4111-4122.

- Navas G., Bernal J. 1999. Caracterización de leguminosas como abono verde para los sistemas de producción del Piedemonte Llanero y Altillanura Colombiana. Boletín Técnico 16:46 pp.
- Netsai N., Moses M., Tuarira M. 2019. Effect of cutting position and vine pruning level on yield of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.). Journal of Arid Land Agriculture 5(1): 1-5.
- Neumann K. H., Kumar A., Imani J. 2020. Some Endogenous and Exogenous Factors in Cell Culture Systems. In: Plant Cell and Tissue Culture-A Tool in Biotechnology. Springer, Cham. pp. 139-158.
- Ninkaew S., Pornpongrungrueng P., Balslev H., Chantaranonthai P. 2017. Seed morphology of nineteen *Crotalaria* L. (Fabaceae) species in Thailand. Thai Forest Bulletin (Botany) 45(1): 47-57.
- Obregón-Cano S., Moreno-Rojas R., Jurado-Millán A. M., Cartea-González M. E., De Haro-Bailón A. 2019. Analysis of the acid detergent fibre content in turnip greens and turnip tops (*Brassica rapa* L. Subsp. *rapa*) by means of near-infrared reflectance. Foods 8(364):1-25.
- Olsen S. R., Dean L.A. 1965. Phosphorus. In: Methods of Soil Chemical Analysis. Black, C. A. (eds.) Part 2. Agronomy 9(1):1035-1049.
- Ongaro V., Leyser O. 2008. Hormonal control of shoot branching. Journal of Experimental Botany 59(1): 67-74.
- Orantes-García C., Moreno-Moreno R. A., Caballero-Roque A., Farrera-Sarmiento O. 2018. Plantas utilizadas en la medicina tradicional de comunidades campesinas e indígenas de la Selva Zoque, Chiapas, México. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 17(5): 503-521.
- Ortiz D. M., Posada S. L., Noguera R. R. 2014. Effect of plant secondary metabolites on methane enteric emission in ruminants. Livestock Research for Rural Development 26(11): 1-25.
- Panda S. K., Das D., Das C. Phytochemical screening, pharmacognostic study and physicochemical evaluation of leaf of *Crotalaria pallida* Aiton. Scholars Research Library 7(10): 239-247.
- Pascualides A. L., Planchuelo A. M. 2007. Seed morphology and imbibition pattern of *Crotalaria juncea* L. (Fabaceae). Seed Science and Technology 35: 760-764.
- Patrick J. W., Colyvas K. 2014. Crop yield components photoassimilate supply or utilisation limited organ development?. Functional Plant Biology 41(9): 893-913. <https://doi.org/10.1071/FP14048>
- Peñaloza G. C., Peláez C. A. 2008. Evaluación de la actividad biológica de extractos de *Crotalaria juncea* mediante el modelo *Drosophila melanogaster*. Vitae 15(2): 279-284.
- Peña-Valdivia C. B., Aguirre R., R., Arroyo-Peña V. 2012. El frijol silvestre: Síndrome de domesticación. Colegio de Postgraduados. México. 206 p.

- Peña-Valdivia C. B., Celis-Velázquez R., Trejo C., López A. O. 2013. Reacción del frijol silvestre (*Phaseolus vulgaris* L.) a la profundidad de siembra. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(1): 89-102.
- Peralta S. M. A., Alcántar-González G., Gómez-Merino F. C., Tejeda-Sartorius O., Trejo-Téllez L. I. 2020. Concentración de azúcares totales en cempasúchil (*Tagetes erecta*) var. inca en respuesta a diferentes porcentajes de sombreado. XVII Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia. Gto., México.
- Pérez-Cornelio B. A., Lagunes-Espinoza L. C., Villarreal-Ibarra E. C., Bolio G. I., Bolaños-Aguilar E. D., Hernández-Villegas M. 2016. Acumulación de biomasa, concentración de proteína y alcaloides totales en chipilín durante su crecimiento. En: *Innovación Tecnológica para la Seguridad Alimentaria*. Primera edición, Villahermosa, Tabasco.
- Pérez-José C., Morales P. A. G., Velasco-Velasco V. A., Santiago E. H., Luna J. R., Ortiz G. R. 2020. Conocimiento tradicional y contenido nutricional de *Salmea scandens*. *CIENCIA ergo-sum, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva* 27(1): 1-11.
- Pérez-Sánchez R. M., Jurado E., Chapa-Vargas L., Flores J. 2011. Seed germination of Southern Chihuahuan Desert plants in response to elevated temperatures. *Journal of Arid Environments* 75: 978-980.
- Peter I., Lehmann J. 2000. Pruning effects on root distribution and nutrient dynamics in an acacia hedgerow planting in northern Kenya. *Agroforestry Systems* 50(1): 59-75.
- Petkova N., Popova A., Alexieva I. 2019. Antioxidant properties and some phytochemical components of the edible medicinal *Malva sylvestris* L. *Journal of Medicinal Plants* 7(1): 96-99.
- Pola G. P., Roque A. C., Gordillo P. I. M., Ramos P. A., Mondragón M. P. R. 2016. Evaluación de galletas con base en chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Miller) IM Johnst., Euphorbiaceae) y chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn., Fabaceae). *Lacandonia* 10(2): 47-52.
- Polhill R. M. 1982. *Crotalaria* in Africa and Madagascar. A.A. Balkema, Rotterdam. 1°ed. 396 pp.
- Ponmurugan P., Gnanamangai B.M., Manjukarunambika K. 2019. Architectural effect of different tea clones on the development of blister blight disease. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 92: 7-14.
- Porta H., Jiménez N. G. 2019. Papel de las hormonas vegetales en la regulación de la autofagia en plantas. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 22: 1-11.
- Porter L. J., Hrstich L. N., Chan B. G. 1986. The conversion of procyanidins and prodelfinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25(1): 223-230. doi:10.1016/S0031-9422(00)94533-3.
- Prusinkiewicz P., Crawford S., Smith R. S., Ljung K., Bennett T., Ongaro V., Leyser O. 2009. Control of bud activation by an auxin transport switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(41): 17431-17436.

- Purcell L. C., Salmeron M., Ashlock L. 2014. Soybean growth and development. Arkansas Soybean Production Handbook. Extension Service Miscellaneous Publications 197. <https://www.mssoy.org/uploads/files/soygrowth-dev-ark.pdf>
- R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Randhawa M. A., Khan A. A., Javed M. S., Sajid M. W. 2015. Green leafy vegetables: a health promoting source. In Handbook of fertility, Chapter 18, 205-220 pp. Academic Press.
- Ranhotra G. S., Gelroth J.A., Leinen S.D., Viñas M.A., Lorenz K.J. 1998. Nutritional profile of some edible plants from Mexico. Journal of Food Composition and Analysis 11(1): 298–304.
- Reed R.C., Bradford K. J., Khanday I. 2022. Seed germination and vigor: ensuring crop sustainability in a changing climate. Heredity (Edinb). doi: 10.1038/s41437-022-00497-2.
- Reeves D. W., Mansoer Z., Wood C. W. 1996. Suitability of sunn hemp as an alternative legume cover crop. In Proceedings of the new technology and conservation tillage. University of Tennessee Agricultural Experiment Station 96(7): 125-130.
- Retamales, J. B., Hancock, J. F. 2018. Blueberries. 2nd edition. Series 28. CABI, Cambridge, MA, USA.393p.
- Riahi J., Nicoletto C., Bouzaein G., Haj-Ibrahim M., Ghezal I., Sambo P., Kouki-Khalfallah K. 2019. Optimization of offshoot outgrowth in globe artichoke using a combination of chemical and mechanical treatments. Agronomy 9(2): 104 doi:10.3390/agronomy9020104
- Rincón S. F., Molina M. J. 1990. Efecto del método de envejecimiento artificial sobre la germinación de semillas de maíz. Agronomía Mesoamericana 1: 51-53.
- Rodríguez-Campos R., Ramos-Torres J. I., Vargas-Reyna L., Olgún-Castillo C. M., Ayala-Guerrero F., Adriano-Anaya M. L., Salvador-Figueroa M. 1998. Efecto del extracto acuoso del chipilín (*Crotalaria longirostrata* Hook & Arnot) en el sueño de la rata. Quehacer Científico en Chiapas 1(2): 47-58.
- Rojas-García A. R., Maldonado-Peralta M. D. L. Á., Sánchez-Santillán P., Ayala-Monter M. A., Álvarez-Vázquez P., Ramírez-Reynoso O. 2021. Scarification treatments in chepil seeds (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.) used to improve their germination. Agro Productividad 14(2): 67-72.
- Romero-Sánchez I., Peña-Valdivia C. B., García-Esteva A., Aguilar-Benítez G. 2020. Caracterización seminal y del desarrollo de *Oenothera rosea* L'Hér. ex Ait. En invernadero. Polibotánica 50: 47-66. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.50.4>
- Roque A. C., Gordillo P. I. M., Gutiérrez G. V., González J. M. L., Sarmiento V. D. R. B., Domínguez, K. E. D. 2011. Elaboración de producto con base en maíz (*Zea mays*) y chipilín (*Crotalaria longirostrata*) para fomentar el consumo de hojas verdes en la alimentación de niños. Lacandonia 5(1): 143-148.

- Roque A. C., Talavera T. A., Echandi M. D., Castillejos D. E. 2017. Los recursos vegetales en la alimentación de mujeres tsotsiles de la Selva El Ocote, Chiapas, México. *Lacandonia* 5(2): 141-147.
- Rouached H., Rhee S. Y. 2017. System-level understanding of plant mineral nutrition in the big data era. *Current Opinion in Systems Biology* 4: 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.07.008>
- Rouached, H., Rhee, S.Y. 2017. System-level understanding of plant mineral nutrition in the big data era. *Current Opinion in Systems Biology* 4: 71–77 <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.07.008>
- RStudio Team. 2020. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Rubio E. E. S., Torres E. C., Rodríguez D. P., Reyes L. O. 2008. Producción estacional de materia seca de gramíneas y leguminosas forrajeras con cortes en el estado de Quintana Roo. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 46(4): 413-426.
- Rzedowski J., Calderón de Rzedowski G., Torres C. L., Grether R. 2016. Flora del Bajío y de regiones adyacentes: Leguminosae (Subfamilia *Papilionoideae* (*AeschynomeneDiphysa*). Instituto de Ecología, Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, México. Vol. 192. 330 p.
- Salinas Morales J. L., Peña-Valdivia C. B., Trejo C., Vázquez-Sánchez M., López Palacios C., Padilla-Chacó D. 2022. Componentes del rendimiento de *Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn. en Guerrero, México. *Polibotánica* 54: 101-121.
- San Miguel C.R., Cortés P.A., Saavedra F.A.L. 2003. The effect of dimethyl sulphoxide (DMSO) on carrot plants grown in the field. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 2003: 101-104.
- Sarwatt S. V., Mkiwa F. E. J. 1988. The current status of knowledge on the feed value of *Crotalaria* species. African forage plant genetic resources, evaluation of forage germplasm and extensive livestock production systems. International Livestock Centre for Africa, Addis Ababa, Ethiopia, pp. 196-203.
- Schupp J. R., Winzeler H. E., Kon T. M., Marini R. P., Baugher T. A., Kime L. F., Schupp M. A. 2017. A method for quantifying whole-tree pruning severity in mature tall spindle apple plantings. *HortScience* 52(9): 1233-1240.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2002. Norma oficial mexicana, NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación. 31 de diciembre de 2002. México, D.F, México. <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documents/Ciga/libros2009/DO2280n.pdf>.

- Sikuku P. A., Musyimi D. M., Kariuki S., Okello S. V. 2013. Responses of slenderleaf rattlebox (*Crotalaria ochroleuca*) to water deficit. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 3(12): 245-252.
- Silva C. B. D., Barbosa, R. M., Vieira, R. D. 2017. Accelerated aging as vigor test for sunn hemp seeds. *Ciência Rural* 47(1): 1-6.
- Silva V. N., Bennett M., Jourdan P., Cicero S. M. 2013. Image Analysis Techniques to Evaluate *Portulaca* Seed Morphology and Vigor. *Seed Technology* 35(1): 75-88.
- Solis-Bonilla J. L., Munoz-Orozco A., Escalante-Estrada J. A. S., Zamarripa-Colmenero A. 2017. Crecimiento de variedades y componentes del rendimiento de higuierilla (*Ricinus communis* L.) en Montecillo, Estado de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(2): 311-323. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i2.346>
- Sosnowski J., Król, J., Truba, M. 2019. The effects of indole-3-butyric acid and 6-benzyloaminopuryn on Fabaceae plants morphometrics. *Journal of Plant Interactions* 14(1): 603-609.
- Sosnowski J., Malinowska E., Jankowski K., Król J., Redzik P. 2019. An estimation of the effects of synthetic auxin and cytokinin and the time of their application on some morphological and physiological characteristics of *Medicago x varia* T. Martyn. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26(1): 66-73.
- Sotelo A., López-García S., Basurto-Peña F. 2007. Content of nutrient and antinutrient in edible flowers of wild plants in Mexico. *Plant Foods for Human Nutrition* 62(3):133-138.
- Soto-Estada C. 2004. *Crotalarieae*. In Dávila A., P., Villaseñor J., R., Medina, L., Télles, V. (Eds.), *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Fascículo 40, pp. 1–20.
- Soto-Hernández R. M., Palma-Tenango M., San Miguel-Chavez, R. 2019. *Fitoquímica experimental*. Colegio de Postgraduados. ISBN: 9786077153894.
- Spencer V., Bentall L., Harrison C.J. 2022. Diverse branching forms regulated by a core auxin transport mechanism in plants. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.09.15.508075>.
- Sultan S. E. 2000. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science* 5(12): 537-542.
- Sunitha S., Ravindran C.S., George J., Sreekumar J. 2015. Effect of pruning on cassava stem, foliage and tuber yield. *Journal of Root Crops* 41(2): 36-41.
- Sussex I. M., Kerk, N.M. 2001. The evolution of plant architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 4(1): 33-37.
- Taiz L., Zeiger E. 2010. *Plant Physiology*. 5aed. Sinauer Associates Inc., Massachusetts.778p.
- Tapia E. 2000. Prehispanic agricultural systems in the Basin of Mexico. In Lentz, D. (Ed.), *Imperfect Balance: Landscape Transformation in the Precolumbian Americas*.

- Tripathi M., Chaudhary B., Bhandari H., Harish E. 2012. Effect of varieties, irrigation and nitrogen management on fibre yield of sunnhemp. *Journal of Crop and Weed* 8: 84-85.
- Tripathi M., Chaudhary B., Singh S., Bhandari H. 2013. Growth and yield of sunnhemp (*Crotalaria juncea* L.) as influenced by spacing and topping practices. *African Journal of Agricultural Research* 8: 3744-3749.
- Uraguchi S., Watanabe I., Yoshitomi A., Kiyono M., Kuno K. 2006. Characteristics of cadmium accumulation and tolerance in novel Cd-accumulating crops, *Avena strigosa* and *Crotalaria juncea*. *Journal of Experimental Botany* 57(12): 2955-2965.
- Vaahtera L., Schulz J., Hamann T. 2019. Cell wall integrity maintenance during plant development and interaction with the environment. *Nature Plants* 5(9): 924-932.
- Van Reeuwijk L. 2002. Procedures for soil analysis. International Soil Reference and Information Centre-Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Van-Mierlo J.E.M., Van-Groenendael J.M. 1991. A population dynamic approach to the control of *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. *Journal of Applied Ecology* 28(1): 128-139.
- Villar E., M. de J., Zavaleta-Mejía E. 1990. Efecto de *Crotalaria longirostrata* Hook & Arnott sobre nematodos agalladores (*Meloidogyne* spp.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 8(2): 166-172.
- Villaseñor, J. L. 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87(3): 559-902.
- Vinicius de Araujo A., Araújo E. F., Ribeiro A. H. T., Silva S. R. E., Cecon P. R. 2018. Time of harvest and storability of *Crotalaria juncea* L. seeds. *Revista Ciencia Agronómica* 49(1): 103-111
- Wadas W., Dziugieł T. 2020. Changes in assimilation area and chlorophyll content of very early potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars as influenced by biostimulants. *Agronomy* 10(3): 387; doi:10.3390/agronomy10030387
- Wang K. H., Spies B. S., Schmitt, D. P. 2002. *Crotalaria* as a cover crop for nematode management: a review. *Nematropical* 32(1): 35-57.
- Weng J. K., Lynch J. H., Matos J.O., Dudareva N. 2021. Adaptive mechanisms of plant specialized metabolism connecting chemistry to function. *Nature Chemical Biology* 17: 1037-1045.
- White P. J., Brown P. H. 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany* 105: 1071-1080. doi:10.1093/aob/mcq085
- Wilson-García C.Y., Zavaleta-Mancera H.A., López-Delgado H., Hernández-Garay A. 2008. La citocinina BAP retrasa senescencia, aumenta antioxidantes, proteína y crecimiento en el pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L.). *Agrociencia* 42(7): 799-806.
- Wink M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64(1): 3-19.

- Wu W., Du K., Kang X., Wei H. 2021. The diverse roles of cytokinins in regulating leaf development. *Horticulture Research* 8(118): 1-13.
- Xu C., Li R., Song W., Wu T., Sun S., Hu S., Han T., Wu C. 2021. Responses of branch number and yield component of soybean cultivars tested in different planting densities. *Agriculture* 11(1): 69. <https://doi.org/10.3390/agriculture11010069>
- Yang Q. H., Yin S. H., Song S. Q., Ye W. H. 2004. Development of desiccation tolerance and germination physiology of *Crotalaria pallida* Ait. seeds. *Seed Science and Technology* 32(1): 99-111.
- Zhang L., Shen C., Wei J., Han W. 2018. Effects of exogenous 6-benzyladenine on dwarfing, shoot branching, and yield of tea plant (*Camellia sinensis*). *HortScience* 53(5): 651-655.