

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Evaluación de los reguladores de crecimiento (Kinetina y Ácido giberélico) para acelerar la germinación de *Gynoxys verrucosa*.

Evaluation of growth regulators (Kinetin and gibberellic acid) to accelerate the germination of *Gynoxys verrucosa*.

J S Cueva & H P Lucero M.

DOI. 10.21931/RB/2018.03.04.8

Resumen: Las especies de bosque nativas de los altos Andes son esenciales para el funcionamiento del ecosistema, un ejemplo es la maleza *Gynoxys verrucosa*, que también es reconocida por sus propiedades para el tratamiento del cáncer. La presente investigación apunta a contribuir al vacío que existe con respecto a su germinación y para ello se emplea técnicas de cultivos *in vitro*. La metodología involucrada en una selección previa de semillas que se sometieron al método de desinfección estándar, aplicando posteriormente reguladores de crecimiento (100 ppm) a diferentes tiempos de exposición. (12-06-24 h), se sembraron posteriormente en viales con cultivo Murashige y Skoog (1962) en cuanto a los resultados se evaluó el efecto de la adición de reguladores del crecimiento de las plantas (kinetina y ácido giberélico) sobre la respuesta de germinación a 15 días se observó una tasa de germinación del 60% con Kinetin y en 17 la tasa de germinación fue del 40% con giberelinas. Los datos se evaluaron utilizando un análisis de varianza (Anova) en bloques aleatorios.

Palabras clave: *Gynoxys verrucosa*, micropropagación, cinetina, ácido giberélico, germinación.

Abstract: Native forest species of the high Andes, are essential to the functioning of the ecosystem, an example is *Gynoxys verrucosa* Weed, which is also recognized by its properties for the treatment of cancer the present research aims to contribute to the vacuum that exists with regard to its germination and for this is employed technical of *in vitro* crops. The methodology involved in a previous selection of seeds, these were subjected to the standard method of disinfection (70% alcohol for 1 min, 20% hypochlorite for 5 min and 2% of Benomil) subsequently applied growth regulators (100ppm) at different exposure times (12-06- 24 h), they were subsequently planted in vials with culture Murashige and Skoog (1962) in terms of the results was evaluated the effect of the addition of regulators of plant growth (kinetin and gibberellic acid) on the germination response to 15 days was observed 60% germination rate with Kinetin and at 17 was 40% germination rate with Gibberellins. The data were evaluated using an analysis of variance (Anova) in random blocks.

Key words: *Gynoxys verrucosa*, micropropagation, kinetin, acid gibberellic, germination.

Introducción

Las especies arbustivas nativas de la zona alto andina, son de mucha importancia dentro de las comunidades rurales¹, debido a que varias especies vegetales presentan ciertas propiedades que han ayudado al tratamiento de innumerables enfermedades². La alta diversidad de plantas que tiene nuestro país, ha contribuido a que las distintas comunidades que han habitado y habitan en esta región, hayan adquirido una gran profundidad de conocimientos sobre las plantas que crecen en su entorno, fundamentalmente en términos de uso y su ecología³. En las provincias de Loja y Zamora Chinchipe las familias más utilizadas para la preparación de remedios caseros son: *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Solanaceae*, *Fabaceae*, *Onagraceae* y *Apiaceae*⁴.

Gynoxys verrucosa Wedd, quien pertenece a la familia de las *Asteraceae*, comúnmente conocida como guangalo^{5, 6}, es utilizada tradicionalmente en las comunidades indígenas del sur para el tratamiento de infecciones de la piel y la cicatrización de heridas por aplicación directa de las hojas en la piel⁴. Resientes investigaciones fitoquímicas del extracto de las hojas mostraron resultados prometedores por su elevada capacidad de luchar contra células tumorales leucémicas; convirtiéndose con esto *G. verrucosa* Wedd en una fuente de

metabolitos secundarios con potencial antineoplásico^{2,5,6}.

Sin embargo, normalmente en los estudios con especies medicinales se observa que no se aplican principios de biología reproductiva y mucho menos en cuanto su germinación⁸. Esto se debe a que los métodos convencionales representan un problema al momento de propagar especies forestales^{7, 8}. La biotecnología aporta con métodos para optimizar el tiempo y el espacio; dentro de ellas, los cultivos *in vitro* son utilizados para propagar plantas en grandes cantidades. Es por ello que la micropropagación es una técnica de cultivos *in vitro* que hace posible alcanzar este objetivo⁷.

En la actualidad es muy escasa la información de *G. verrucosa* Wedd, pero ciertas características como el florecimiento y la maduración de los frutos que es de aproximadamente de dos meses; además presenta una capacidad de germinación baja⁹. Nos llevó a considerar algunas investigaciones que resaltan la necesidad de aplicar métodos químicos para incrementar la respuesta germinativa de las semillas; ya que la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas pueden ser controladas por aplicación exógena de reguladores de crecimiento vegetal, ciertas concentraciones fisiológicas podrían actuar como promotoras o inhibidoras de ambos procesos⁹.

¹ Proyecto "Distribución geográfica, asociaciones micorrízicas, propagación y diversidad genética y química de especies vegetales de interés medicinal en la región Sur del Ecuador", Universidad Técnica Particular de Loja, Área Biológica, Departamentos de Ciencias Naturales y de Química, San Cayetano Alto, Calle Paris, Loja, Ecuador

Dentro de los reguladores del crecimiento más estudiados en lo que se refiere a germinación, se encuentran el ácido giberélico (AG3); pero en la actualidad se han evaluado otras hormonas como las kinetinas, las cuales se han empleado para estimular la germinación de semillas de diferentes especies forestales, observando resultados prometedores¹. En consecuencia, la presente investigación se planteó como objetivo general "Evaluar reguladores de crecimiento vegetal en la disminución del tiempo hasta la germinación de *G. verrucosa* Wedd" y como objetivos específicos: Evaluar el efecto de la kinetina y el AG3 en la aceleración de la germinación de *G. verrucosa* Wedd y obtener individuos sanos a partir de la germinación *in vitro*.

Materiales y métodos

Área de estudio

El desarrollo de la presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de fisiología vegetal del Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Técnica Particular de Loja.

Material vegetal

El material vegetal (semillas) se obtuvo de diferentes poblaciones en la provincia de Loja (Yangana, Villonaco, Celica). El material vegetal que se colectó, consistía en frutos maduros próximos a la dehiscencia.

Desinfección de las semillas

Con las semillas colectadas se realiza un proceso previo a la desinfección, el cual consiste en la separación de las semillas vanas y las semillas buenas (semillas secas de semillas "llenas" respectivamente); estas fueron colocadas en cajas Petri y se mantuvieron a temperatura ambiente, para luego ser desinfectadas; para lo cual se fusionó un protocolo estándar modificándolo en cuanto a sus concentraciones y el proceso consiste en: agitación por 1 min con alcohol al 70% (Las semillas son colocadas en un tubo falcón de 50mL), seguido de enjuague con agua destilada estéril; lavado en hipoclorito de sodio comercial diluido al 20% con una gota de jabón líquido por 5 minutos y un lavado con agua destilada estéril; para finalizar la desinfección y como escarificante se agrega agua oxigenada al 10% de igual manera se agita por 5min y se procede a enjuagar con agua estéril 10-11.

Tratamiento de las semillas

En cuanto al tratamiento de las semillas se consideraron diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, como: kinetina (Kin) (citoquininas) (100-200-300 ppm) y ácido giberélico (AG3) (giberelinas) (100-200-300 ppm). A los cuales una vez cumplido el proceso de desinfección, se le agrega tratamiento por tiempos establecidos de 6, 12 y 24 horas por cada tratamiento, al efectuar el tiempo establecido retiramos el tratamiento y se prepara 2g de Benomil en 100ml de agua destilada, el cual se agrega en cada tubo falcón que cumplió su tiempo de exposición^{10,11}.

Siembra

El medio de cultivo *in vitro* utilizado es el Murashigie & Skoog, 1962 (MS), el cual se prepara sin suplementos. La siembra se realiza en condiciones asépticas, en una cámara de flujo laminar, usamos una micropipeta de 5ml, debido a que las semillas son pequeñas para la siembra; se colocarán 10

semillas en cada frasco con medio de cultivo MS, así también haremos uso de pinzas esterilizadas para fijar las semillas en el medio. Finalmente, los frascos serán correctamente etiquetados y colocamos en el cuarto de crecimiento hasta su germinación.

Diseño experimental

El diseño experimental fue de bloques completos al azar. Como factores se consideró Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV), tiempo de exposición al tratamiento, proveniencia de la semilla. Los RCV fueron kinetina (KIN) y giberélica (AG3) Como se observa en la Tabla 1. Los tiempos de exposición fueron 6, 12 y 24 horas. Cada tratamiento consistió de 5 frascos. En cada frasco se sembraron 10 semillas.

Tratamiento	Tiempos de exposición (Horas)		
	6	12	24
KIN	T6-K	T12-K	T24-K
GIB	T6-G	T12-G	T24-G
CONTROL	C6	C12	C24

Tabla 1. Diseño experimental planteado para la evaluación de los tratamientos y sus periodos.

Análisis estadístico

A cada frasco que germinó se contará el número de semillas germinadas, para luego evaluar si existe un efecto positivo de los reguladores de crecimiento (KIN y AG3) en la germinación; para los individuos sanos (individuos que sobrevivieron después de la germinación) se le coloca a cada frasco el valor de 1. Para el análisis de cada uno de los datos se evaluó con una prueba estadística de ANOVA, la prueba de Brown-forsythe y la prueba de Bartlett en el programa estadístico (Prism versión 6.2) que nos permitió estimar el mejor regulador de crecimiento y en qué tiempo de exposición.

Resultados

Para responder nuestro primer objetivo, el manejo de las semillas sometidas a tratamientos con reguladores de crecimiento la tabla 2, nos da un resumen de los resultados obtenidos de un total de 392 frascos sembrados *in vitro*, de los cuales 112 frascos han dado respuesta de germinación. El regulador de crecimiento que mayor respuesta ha tenido es Kinetina presentando un total de 185 plántulas germinadas, en 15 días; Así también el Ácido Giberélico del mismo modo presenta resultados prometedores, a partir de 17 días después de la siembra se observa germinación en un total de 100 plántulas.

Normalmente se ha observado que los frascos control o blanco mostraron baja germinación; los pocos frascos que germinaron fue en 25 días. La figura 1, muestra el comportamiento que se dio con la aplicación de reguladores de crecimiento; la pruebas de ANOVA, la prueba de Brown-forsythe y la prueba de Bartlett, basadas en las medias y la varianza de nuestros datos nos arrojan un $P < 0.05$, con lo cual podemos definir que existe diferencias significativas, ya sea en los tratamientos frente a sus controles; y en cuanto al mejor tratamiento se observa que es KIN de 24H con un total de 84 plántulas germinadas, el más bajo 12h KIN.

Al evaluar una mayor concentración de reguladores, en la figura 2, se observa la disminución del patrón de germinación, a pesar que existe diferencias significativas, se determinó que el porcentaje de germinación es bajo con el aumento de la concentración de RCV, las KIN que anteriormente en concen-

TRATAMIENTO	TIEMPOS EXPOSICIÓN	FRASCOS GERMINADOS	Nº SEMILLAS GERMINADAS POR FRASCO	Nº FRASCOS CONTAMINADOS
KIN	24H	29	84	15
KIN	12H	11	32	0
KIN	6H	29	69	0
AG ₃	24H	18	41	5
AG ₃	12H	13	33	0
AG ₃	6H	11	26	0

Tabla 2. Síntesis de resultados de germinación.

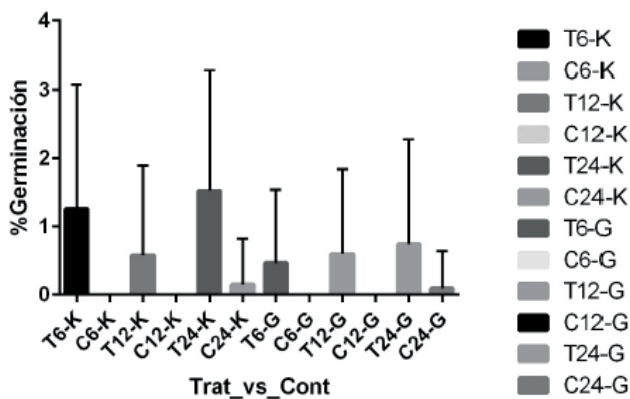


Figura 1. Comportamiento de los tratamientos frente a sus controles.

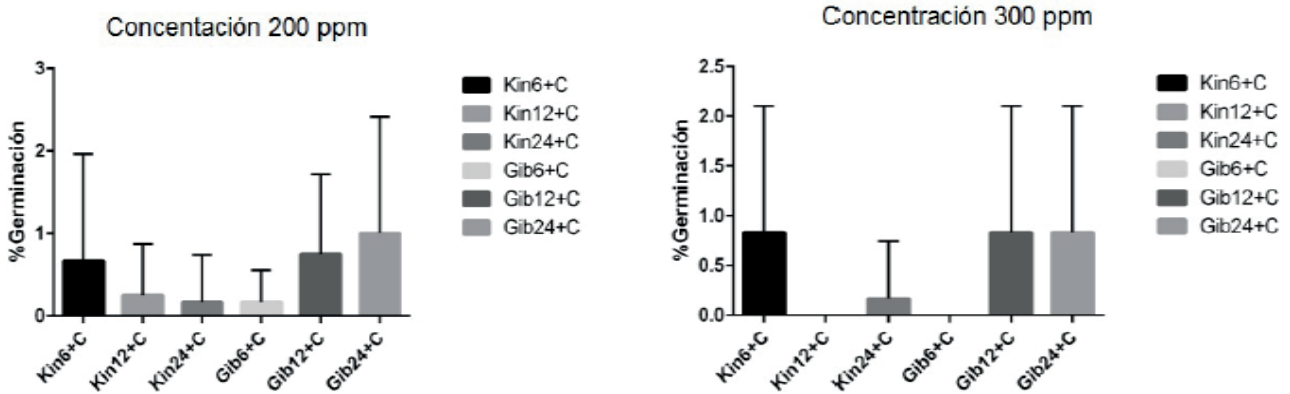


Figura 2. Respuesta de germinación con aumento de concentración de 200 y 300 ppm.

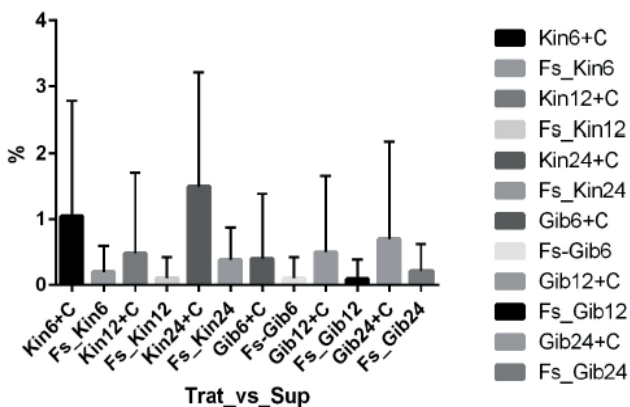


Figura 3. Evaluación de la supervivencia (Tratamientos frente a la supervivencia).

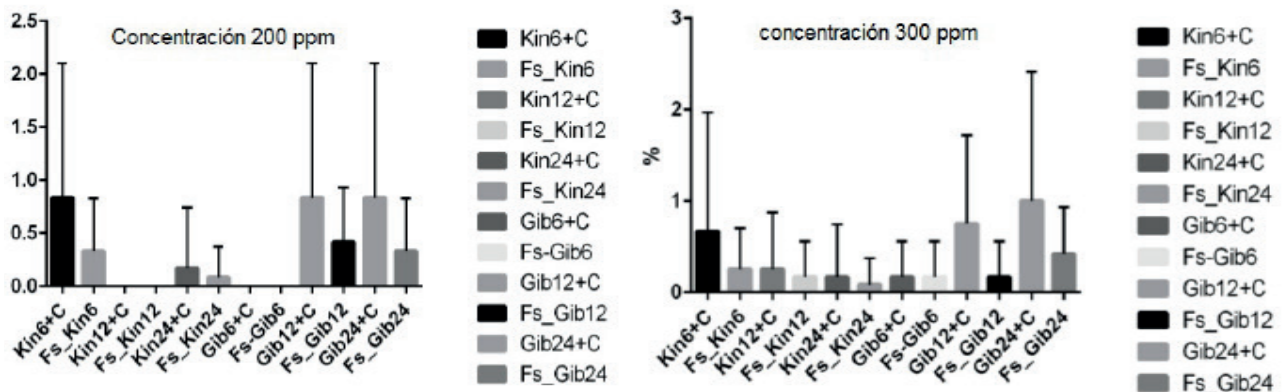


Figura 4. Tratamientos frente a la supervivencia en concentración de 200 y 300 ppm.

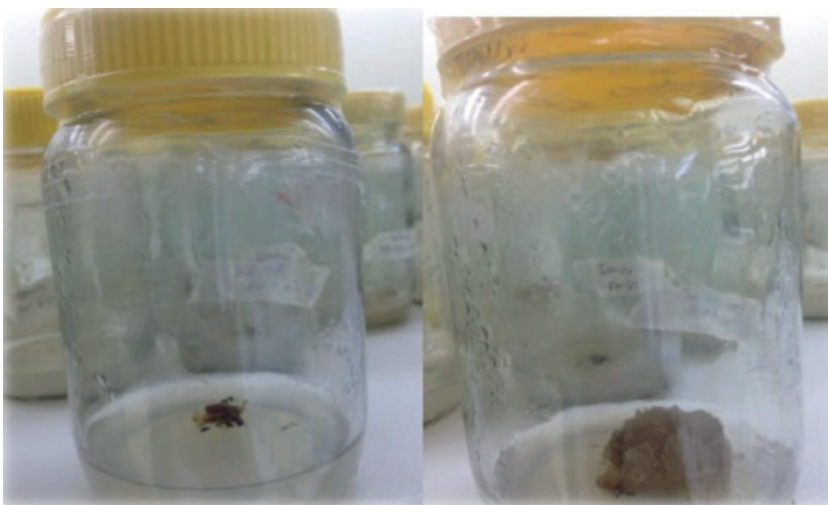


Figura 5. Formación de callos, el primero con KIN 24h y el segundo de AG₃ 24h.

traciones de 100 ppm fueron positivas para dar respuesta a la germinación, en este caso al aumentar la concentración hay tratamientos que no estimulan la germinación, sin embargo esto no sucede con las AG₃, que se observa respuesta germinativa con 200 y 300 ppm.

Habitualmente se observó que las plántulas crecen en el primer mes después de la germinación sin ningún problema, sin embargo, después de 30 días, algunas plántulas sufren necrosamiento en sus tejidos mientras que otras se contaminan. Es por esta razón en el presente estudio para dar respuesta al segundo objetivo, se evalúa a cada individuo que sobrevivió.

Por lo tanto lo que se evaluó, fue la comparación de los datos de germinación que se obtuvo por tiempo y tratamiento frente a los que lograron sobrevivir; en la figura 4, se muestra la reducción de la supervivencia (Fs_Kin/Gib), lo que indica que la supervivencia no está relacionada con los tratamientos; como se indicó anteriormente el mejor tratamiento fue KIN, sin embargo no fue tan exitosa en cuanto a la supervivencia, todo lo contrario a lo que sucede con AG₃, gran parte de los individuos que germinaron si logran sobrevivir; se apreció el mismo patrón en las concentraciones de 200 y 300 ppm, figura 4 en donde se corrobora que AG₃ responde mejor a la supervivencia.

Como una respuesta positiva de los individuos que sobrevivieron, tomando en cuenta que no fue parte del cumplimiento de los objetivos; en la figura 5, se observa la obtención de callos a partir de las semillas que lograron sobrevivir, en cada uno de los tratamientos en sus diferentes tiempos de exposición, se consiguió formar callos, sin embargo cabe mencionar

que son más exitosos los que estuvieron expuestos con los tratamientos de AG₃.

Discusión

Los resultados obtenidos nos han permitido determinar la efectividad de los reguladores de crecimiento, en cuanto a la aceleración de la en la germinación, como se observa en la Tabla 2, el porcentaje de germinación por frasco en cada tratamiento es bajo, relativamente hablando ya que en la naturaleza la estrategia de producir muchas semillas, estrategias "K" y "R" representan porcentajes de germinación menores a 10%¹². Tomando en cuenta que el material vegetal con el que se trabajó fue obtenido directamente del campo, es decir que son variedades naturales no seleccionadas; la mayoría de estudios "in vitro" emplean semillas comerciales, es decir aquellas que han sufrido un tipo de selección.

Normalmente la familia *Asteraceae* presenta la característica de producir una gran cantidad de semillas con fines de lograr mayor supervivencia, pero no todas poseen reservas energéticas. Lo que provoca el deterioro de las semillas, por lo que la calidad de la misma se ve afectada por daños mecánicos, humedad de la semilla, patógenos y muchos otros factores que afectan su recuperación¹³.

Por lo tanto, la metodología con la que se trabajó en el presente estudio fue un aspecto muy importante, ya que está directamente relacionada con la latencia de la semilla, de igual manera los tratamientos que se llevaron a cabo con el

fin de acelerar el proceso de germinación o promover el establecimiento de plántulas. Se considera que varias hormonas y compuestos nitrogenados pueden ayudar a romper la dormancia bajo ciertas condiciones, y pueden tener al mismo tiempo un impacto directo sobre la germinación¹¹.

La pérdida de la capacidad de germinación podría estar relacionada con los cambios en el balance endógeno de los reguladores del crecimiento vegetal en la semilla, por lo que se recomienda de un suministro de éstas para estimular la germinación; se han reportado algunos estudios con reguladores de crecimiento, entre las que se destacan se encuentra las Giberelinas (AG₃), pero en la actualidad se han visto resultados prometedores con Citoquininas (Kimetina)¹⁰.

Las primeras investigaciones *In vitro* con *G. verrucosa* fueron a partir de estacas para la obtención de brotes, en el cual se observó una respuesta de 68% en un periodo de 60 días, con alto riesgo de contaminación¹⁴. Pero para evitar esto se trabajó con semillas, las cuales se obtuvo respuesta en 15 y 17 días con la utilización de Reguladores de crecimiento vegetal (RCV).

Las diferencias mostradas en la Figura 2, destacan que KIN respondió favorablemente en el tiempo de germinación, según algunos estudios en el que aplicaron ensayos con kinetinas (KIN) observaron que dichas hormonas presentan mejor respuesta al estrés biótico¹⁵; esto se debe a que éstas promueven respuesta de defensas al momento de germinar, lo que favorece a la activación de las semillas. Comprobando con esto que las KIN ejercen su acción principalmente en las semillas que están bajo condiciones de estrés¹⁶.

No obstante, el efecto de AG₃ también respondió de una manera positiva, del cual se obtuvo resultados en 17 días, y de igual manera son efectivas en semillas que sufren condiciones de estrés o latencia. El problema está en la concentración que se trabaje, debido a que aún no hay estudios que definan una concentración adecuada, para obtener resultados más prometedores. Se considera que el efecto de las Giberelinas y las Kinetinas no es muy claro y en algunos casos es contradictorio, esto se debe a las concentraciones con las que se trabaje; por lo que es necesario investigar función de RCV para *Asteraceae*¹⁷.

En cuanto a la respuesta germinativa se podría decir que ha sido efectiva, en un porcentaje de 45% de todos los ensayos realizados; normalmente por frasco germinan de 2 a 3 semillas. Lo máximo que se ha observado ha sido de 6 semillas, pero no es tan común, en consecuencia se consideró realizar ensayos con una mayor concentración entre 200 y 300 ppm, con el fin de aumentar el número de semillas germinadas. Sin embargo, se observa que con la adición de RCV no incrementa de manera significativa la germinación de semillas (Figura 3); se piensa que con el aumento de las concentraciones de RCV se inhiben procesos internos de las semillas, con lo cual se afecta a la germinación¹⁸.

Consecuentemente al evaluar la supervivencia se observa que se da un proceso antagónico con las KIN, lo que no sucede con AG₃. Se considera que esto es por el medio (MS) que se utilizó; pues, la permanencia de los diferentes minerales que componen la fórmula del MS tiene una duración diferente entre sí. Es así que las concentraciones de amonio: nitrato pueden volatilizarse en un tiempo relativamente corto; mientras que los compuestos a base de Potasio y fósforo tendrían un mayor tiempo de permanencia. Por lo tanto, se especula que esa sea la razón para las respuestas percibidas en los cultivos¹⁹.

Se señala para obtener una mayor viabilidad en la supervivencia de las semillas, hay que considerar evaluar factores como la temperatura, luz humedad. Debido a que son estos

los activan o desactivan a los RCV. Ciertos estudios mencionan que se observa mayor supervivencia en condiciones alternando luz y oscuridad, dichas condiciones permiten la activación del metabolismo de las AG₃, lo que favorece a la supervivencia a las plantas que fueron inducidas con este RCV²⁰.

Por otro lado, podemos definir que tanto las condiciones manejadas *in vitro* como la humedad de los frascos en los que se sembraron, el periodo de luz al que estuvieron sometidas las semillas, y los RCV aplicados de manera externa. Representaron ser las adecuadas como se observa en la figura 6, el estímulo brindado por dichas condiciones, son significativas para lograr un proceso de desdiferenciación para la obtención de callos.

A pesar que en la mayoría de estudios el suministro de hormonas se realiza directamente al medio de cultivo. En el presente estudio se lo desarrollo con un enfoque diferente (acelera la germinación) obteniendo resultados hasta este punto. Por consiguiente, queda la oferta abierta, para el desarrollo de las etapas faltantes, debido al éxito de esta investigación.

Conclusiones

Aparentemente se podía considerar que fue un porcentaje bajo de germinación; teniendo presente que las semillas fueron seleccionadas directamente de sus sitios naturales. Donde *G. verrucosa* Weed posee la característica de producir un gran número de semillas; pero esto no garantiza un éxito de germinación. A lo que, si podemos atribuir la respuesta de germinación, es al manejo adecuado del protocolo de desinfección ya que nos permitió una escarificación correcta de la semilla. Así también la aplicación de los RCV, a pesar que aún no existe una concentración adecuada para trabajar con especies arbustivas. Tomando en cuenta los resultados que se obtuvieron en cuanto a la aplicación se recomienda trabajar con una concentración menor a 100 ppm; ya que como se observó al momento de aumentar la concentración en algunos casos se inhibía la germinación.

Referencias bibliográficas

1. Cárdenas, M. (2011). " Determinación Del Protocolo De Establecimiento Y Multiplicación In Vitro De Quishuar (Buddleja Incana), A Partir De Yemas Axilares De Plantas Madre , Como Una Especie Dentro Del Distrito Metropolitano De Quito ." Escuela Politécnica Del Ejército.
2. Herrera, D. (2009). Evaluar La Actividad Genotóxica Del Extracto Metanólico De *Gynoxis Verrucosa* Mediante El Ensayo Cbmn En La Línea Celular Astrocitoma Cerebral (D384). Universidad Tecnica Particular De Loja.
3. Minga, D. (2014). Relación Entre Conocimiento Tradicional Y Diversidad De Plantas En El Bosque Protector Aguarongo Azuay Ecuador. Universidad Politécnica Salesiana.
4. Tene, V., Malagón, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An Ethnobotanical Survey Of Medicinal Plants Used In Loja And Zamora-Chinchiipe, Ecuador. *Journal Of Ethnopharmacology*, 111(1), 63–81. <http://doi.org/10.1016/J.Jep.2006.10.032>
5. Ordóñez, P., Quave, C. L., Reynolds, W. F., Varughese, K. I., Berry, B., Breen, P. J., Compadre, C. M. (2011). Sesquiterpene Lactones From *Gynoxys Verrucosa* And Their Anti-Mrsa Activity. *Journal Of Ethnopharmacology*, 137(2), 1055–9. <http://doi.org/10.1016/J.Jep.2011.07.012>
6. Bailon-Moscoco, N., González-Arévalo, G., Velásquez-Rojas, G., Malagon, O., Vidari, G., Zentella-Dehesa, A., ... Ostrosky-Wegman, P. (2015). Phytometabolite Dehydroleucodine Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis, And Dna Damage In Human Astrocytoma Cells

- Through P73/P53 Regulation. Plos One, 10(8), E0136527. [Http://Doi.Org/10.1371/Journal.Pone.0136527](http://doi.org/10.1371/journal.pone.0136527)
7. Castillo, M., & Peralta, C. (2007). Estado De Conservación, Propagación Asexual Y Sexual En Invernadero Y Laboratorio De Dos Especies De Podocarpaceas, Procedentes De La Reserva Comunal Angashcola. Universidad Nacional De Loja.
 8. Brandbyge, J. (1991). Reforestación De Los Andes Ecuatorianos Con Especies Nativas. Cesa - Intercooperación Suiza, 1-79. Retrieved From [Http://Www.Rdrredlatina.Info/Biblioteca/Eces_Reforestacion_Andes_Completo.Pdf](http://www.rdrredlatina.info/Biblioteca/Eces_Reforestacion_Andes_Completo.Pdf)
 9. Amador, K., Díaz, J., Loza, S., & Eglá, B. (2003). Efecto De Diferentes Reguladores De Crecimiento Vegetal Sobre La Germinación De Semillas Y Desarrollo De Plántulas De Dos Especies De Ferocactus (Cactaceae). Journal Of Hubei Agricultural College, 23(35), 161-163.
 10. George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G.-J. De. (2008). Plant Propagation By Tissue Culture 3rd Edition Vol 1. The Background. Springer (Plant Prop). [Http://Doi.Org/10.1007/978-1-4020-5005-3_1](http://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_1)
 11. Schmidt, L. (2000). Dormancy And Pretreatment. In Guide To Handling To Tropical And Subtropical Forest Seed (Pp. 1-40). [23] Mandujano, M., Golubov, J., & Rojas, M. (2007). Efecto Del Ácido Giberélico En La Germinación De Tres Especies Del Género Opuntia (Cactaceae) Del Desierto Chihuahuense. Cactáceas Y Suculentas Mexicanas, 52(2), 46-52.
 12. Baskin, C. ., & Baskin, J. . (1998). Seeds, Ecology, Biogeography And Evolution Of Dormancy, And Germination. Academic Press (Vol. 36). San Diego. [Http://Doi.Org/10.1006/Appe.2000.0378](http://doi.org/10.1006/appe.2000.0378)
 13. Mng'omba, S. A, Du Toit, E. S., & Akinnifesi, F. K. (2007). Germination Characteristics Of Tree Seeds: Spotlight On Southern African Tree Species. Tree For. Sci. Biotechnol., 1(1), 1-8. Retrieved From [Http://Www.Worldagroforestry.Org/Downloads/Publications/Pdfs/Ja07164.Pdf](http://www.worldagroforestry.org/downloads/publications/Pdfs/Ja07164.Pdf)
 14. Ochoa, K. (2015). Análisis De La Reproducción Asexual Y Porcentaje De Colonización De *Gynoxys Verrucosa*, Perteneciente A La Etnobotánica De La Etnia Saraguro. Universidad Técnica Particular De Loja.
 15. Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant Hormone-Mediated Regulation Of Stress Responses. BMC Plant Biology, 16(1), 86. [Http://Doi.Org/10.1186/S12870-016-0771-Y](http://doi.org/10.1186/s12870-016-0771-y)
 16. Nikolic, R., Mitic, N., Zivkovic, S., Grubisic, D., & Neskovic, M. (2007). Cytokinins And Urea Derivatives Stimulate Seed Germination In Lotus Corniculatus L. Archives Of Biological Sciences, 59(2), 125-128. [Http://Doi.Org/10.2298/Abs0702125n](http://doi.org/10.2298/abs0702125n)
 17. Gómez-Matínez, M., Reyes-Valdes, M. ., Martínez-Reyna, J. ., Escobedo-Bocardo, L., & García-Osuna, H. (2010). Rescate De Embriones En Híbridos Intergenéricos *Helianthus Annuus* X *Titthonia Rotundifolia*. Acta Botanica Mexicana, 93, 111-119.
 18. Zárate, R., Cantos, M., & Troncoso, A. (1997). Efecto De Diferentes Reguladores De Crecimiento En La Inducción De Brotes Múltiples Y Enraizamiento De *Atropa Baetica*. Csic, Irnas Sevilla, 464-471.
 19. Bonga, J. M., & Von Aderkas, P. (1992). In Vitro Culture Of Trees. (Vol. 38). Springer Science & Business Media. Kluwer Academic Publishers.
 20. Mandujano, M., Golubov, J., & Rojas, M. (2007). Efecto Del Ácido Giberélico En La Germinación De Tres Especies Del Género Opuntia (Cactaceae) Del Desierto Chihuahuense. Cactáceas Y Suculentas Mexicanas, 52(2), 46-52.

Recibido: 4 octubre 2018

Aprobado: 2 diciembre 2018