



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMEDICA**

TÍTULO DE BIÓLOGO

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

TRABAJO DE TITULACIÓN

**AUTOR:** Cueva Macas, Jonathan Stiwart

**DIRECTOR:** Lucero Mosquera, Hernán Patricio, Ing.

LOJA – ECUADOR

2016

## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ing.

Hernán Patricio Lucero Mosquera

### DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: "Evaluación de los reguladores de crecimiento (Kinetina y Ácido giberélico) para acelerar la geminación de *Gynoxys verrucosa*" realizado por: Cueva Macas Jonathan Stiwart, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, ..... de 2016

f).....

Lucero Mosquera, Hernán Patricio

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Jonathan Stiwart Cueva Macas declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Evaluación de los reguladores de crecimiento (Kinetina y Ácido giberélico) para acelerar la geminación de *Gynoxys verrucosa*, de la Titulación de Biología, siendo el Ing. Hernán Patricio Lucero Mosquera, director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen através, con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f. ....

Cueva Macas, Jonathan Stiwart

1104561574

## DEDICATORIA

A mi madre Julia Margarita, por toda la fuerza y el cariño que me das, tú me has enseñado que ante las adversidades de la vida, siempre hay que saber levantarse y seguir adelante; sin duda alguna con todo el cariño le dedico a mi padre Bolívar Hernán, por cada uno de tus consejos y por enseñarme el valor de la humildad. En realidad es por ustedes que hoy estoy aquí culminado una etapa más de mi vida.

A mi hermano Kevin, a pesar de cada una de nuestras diferencias, de una u otra forma siempre estuviste ahí apoyándome a seguir adelante.

Sin más adjunto una frase de Paulo Coelho que me ha ayudado mucho en cada uno de mis días. "Nadie sabe lo que va a pasar en el próximo minuto, e incluso así, las personas van hacia adelante. Porque confían, porque tienen fe".

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer primeramente a Dios por darme la bendición de tener a mis padres, ya que ellos son mi fuerza y voluntad para seguir luchando día tras día.

Al Departamento de Ciencias Naturales de la UTPL, por cada uno de los materiales y recursos brindados.

A cada uno de los docentes de la titulación de Biología por haber compartido sus conocimientos para nuestra formación.

Al Ing. Hernán Lucero, más que un tutor un gran amigo que siempre tuvo un consejo y una actitud positiva para arreglar de mejor manera cada problema que se nos presentó.

A mis grades amigos que la vida me brindó la oportunidad de tener como: Danilo, Tangya, Daniel, Allison, Andrea, Wilson I, Wilson Z y cada uno de mis compañeros de Biología (FAR y RAF), por su apoyo, consejos y por todas las experiencias vividas, definitivamente la vida es más llevadera si cuentas con amigos que están locos igual a ti.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b> .....	II
<b>DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS</b> .....	III
<b>DEDICATORIA</b> .....	IV
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	V
<b>TABLA DE CONTENIDO</b> .....	VI
<b>INDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	VIII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1. MARCO TEÓRICO.....	8
1.1. Generalidades sobre <i>Gynoxys</i> .....	9
1.1.1. Taxonomía.....	9
1.1.2. Rasgos de la especie.....	9
1.1.3. Distribución .....	10
1.2. Etnobotánica .....	10
1.2.1. Usos, propiedades y aplicaciones.....	11
1.2.2. Metabolitos secundarios.....	11
1.3. Micropropagación .....	12
1.3.1. Germinación <i>In vitro</i> .....	13
1.3.2. Métodos de regeneración de plantas.....	13
1.3.3. Medios de cultivo.....	14
1.3.4. Reguladores de crecimiento.....	15
1.3.4.1. Citoquininas.....	16
1.3.4.2. Ácido giberélico.....	16
1.4. Factores que influyen crecimiento <i>In vitro</i> .....	17
1.4.1. Cuidado en el manejo <i>In vitro</i> .....	18
1.5. Objetivos .....	19
1.5.1. Objetivo general.....	19
1.5.2. Objetivos específicos.....	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
2.1. Área de estudio.....	21
2.2. Material vegetal.....	21
2.3. Desinfección de las semillas.....	21

2.3.1. Tratamiento de la semilla.....	22
2.4. Siembra.....	22
2.5. Diseño experimental.....	22
2.6. Análisis estadístico.....	23
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
3.1. Resultados.....	25
3.2. Discusión.....	28
Conclusiones.....	31
Recomendaciones.....	32
Bibliografía.....	33
ANEXOS.....	41

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### Figuras:

Figura 1 Características de morfológicas <i>G. verrucosa Wedd</i> .....	10
Figura 2. Comportamiento de los tratamientos frente a sus controles .....	26
Figura 3. Respuesta de germinación con aumento de concentración de 200 y 300 ppm.....	26
Figura 4. Evaluación de la supervivencia (Tratamientos frente a la supervivencia).....	27
Figura 5. Tratamientos frente a la supervivencia en concentración de 200 y 300 ppm.....	27
Figura 6. Formación de callos, el primero con KIN 24h y el segundo de AG <sub>3</sub> 24h.....	28

### Tablas:

Tabla 1. Diseño experimental planteado para la evaluación de los tratamientos y sus periodos .....	22
Tabla 2. Síntesis de resultados de germinación.....	25

## RESUMEN

Las especies forestales nativas de la zona alto andina, son fundamentales para el funcionamiento del ecosistema un ejemplo es *Gynoxys verrucosa* Weed, la cual es además reconocida por sus propiedades para el tratamiento del cáncer. La presente investigación pretende brindar un aporte al vacío que existe con respecto a su germinación y para ello se empleó técnicas de cultivos *in vitro*. La metodología consistió, en una previa selección de semillas, estas fueron sometidas a varios métodos de desinfección (70% alcohol por 1 min, 20% de hipoclorito por 5 min y 10% Agua destilada), posteriormente, se aplican reguladores de crecimiento (100ppm) a diferentes tiempos de exposición (6-12-24 h), posteriormente se sembraron en frascos con medio de cultivo Murashige y Skoog, (1962). En cuanto a los resultados se evaluó el efecto de la adición de reguladores de crecimiento vegetal (kinetina y ácido giberélico) sobre la respuesta germinativa, se observó 60% de germinación con Kinetina y a los 17 se observó 40 % de germinación con Giberelinas. La evaluación de datos se realizó con un análisis de varianza (Anova) en bloques al azar.

PALABRAS CLAVE: *Gynoxys verrucosa*, *in vitro*, kinetina, 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 the cancer the present research aims to provide a contribution to the vacuum that exists with regard to its germination and for this is employed technical of crops vitro. The methodology involved in a previous selection of seeds, these were subjected to several methods of disinfection (70% alcohol for 1 min, 20% hypochlorite for 5 min and 10% Distilled water) 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 forestales nativas de la zona alto andina, son de mucha importancia dentro de las comunidades rurales, de ellas se obtienen importantes productos medicinales (Cárdenas, 2011). Así como también el uso de especies vegetales para las prácticas médicas que se han convertido un importante factor de investigación, gracias a ciertas propiedades que han ayudado al tratamiento de innumerables enfermedades (Herrera, 2009).

El presente trabajo está dividido en tres capítulos. El primer capítulo es el Marco teórico, en el que se mencionan el fundamento teórico en que se basó la investigación, así también dentro de este capítulo incluye el objetivo general y los específicos. El segundo capítulo corresponde a la metodología desarrollada para dar respuestas a los objetivos, la cual consistió en un proceso de selección de semillas de *Gynoxys verrucosa* Wedd, fueron sometidas a varios métodos de desinfección (70% alcohol por 1 min, 20% de hipoclorito por 5 min y 10% Agua destilada), una vez desinfectadas, se aplican reguladores de crecimiento en diferentes tiempos de exposición (6-12-24 h), luego se sembraron en frascos con medio de cultivo Murashige y Skoog, (1962). Con esto se intenta evaluar el efecto de la adición de reguladores de crecimiento vegetal (KINETINA Y ÁCIDO GIBERÉLICO) sobre la respuesta germinativa.

Normalmente en los estudios con especies medicinales se observa que no se aplican principios de conservación integral de la biodiversidad (Castillo & Peralta, 2007; Malagón, 2015). Así también se destaca la dificultad para propagar las especies por los métodos convencionales (Brandbyge, 1991; Castillo & Cueva, 2006; Castillo & Peralta, 2007), existiendo la necesidad de implementar mecanismos de propagación de plantas por medio de semillas, debido a que interviene en gran parte en el mantenimiento de la diversidad genética de las especies, contrario a lo que ocurre con los métodos de propagación asexual o vegetativa; por tal razón son eficientes para la conservación y mantenimiento de sus poblaciones en el campo (Amador et al., 2003).

Actualmente algunas investigaciones resaltan la necesidad de aplicar métodos químicos para incrementar la respuesta germinativa de las semillas; 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 inhibitoras de ambos procesos (Amador et al., 2003). Hasta la actualidad no existen estudios de germinación *in vitro* para *G. verrucosa* Wedd, para ello, se desarrolla el programa "Distribución geográfica, asociaciones micorrícicas, propagación y diversidad genética y química de especies vegetales de interés medicinal en la región Sur del Ecuador" entre los

Departamentos de Ciencias Naturales y de Química, en el que uno de sus objetivos establecer métodos de propagación para *G. verrucosa* Wedd y así aportar a la obtención de individuos que puedan ser utilizados en posteriores estudios de conservación.

## **1. MARCO TEÓRICO**

## 1.1. Generalidades sobre *Gynoxys*

Dentro de la familia *Asteraceae* se incluye el género *Gynoxys* el cual es de muy difícil taxonomía y las diferentes especies solo pueden ser reconocidas por especialistas (Brandbyge, 1991); se la puede encontrar en bosques montanos o paramos entre 1500 a 4000 m s.n.m. (Correa, 2003). Una de las características de las *Asteraceae* es la apomixis, que le ha permitido la colonización de los páramos andinos (Quero, Enríquez, Morales, & Miranda, 2010). Por tal razón se considera que dicha característica juega un papel fundamental en el proceso evolutivo de *Gynoxys* (Musiał & Kościńska-pająk, 2013), además presenta una reproducción sexual por semillas y asexual a partir de estolones y estacas (Benenaula, 2007), y el tiempo entre el florecimiento y la maduración de los frutos es de cerca de dos meses; puede ser encontrada floreciendo y fructificando todo el año, sin embargo presenta una capacidad de germinación baja (Brandbyge, 1991).

### 1.1.1. Taxonomía.

La taxonomía de esta especie no está bien definida, razón por la cual algunos taxónomos la clasifican hasta el nivel de género (Brandbyge, 1991; Ordóñez, Aguirre, & Hofstede., 2001). Por otra parte, *Gynoxys verrucosa* es un arbusto perteneciente a la tribu *Senecioneae* de la familia *Asteraceae* (Tene et al., 2007).

A pesar de la escasez de material o de colecciones, hasta el momento se considera que el género de *Gynoxys verrucosa* es similar a *Aequatorium* (Fig. 1), sin embargo Nordenstam indicó que el género ofrece conexiones directas con el subgénero *Paragynoxys*, pero de igual manera comprobó que pertenece a *Gynoxys* como la describió Weed en un inicio (Díaz-Piedrahíta & Cuatrecasas, 1990).

### 1.1.2. Rasgos de la especie.

*G. verrucosa* Weed, son árboles o arbustos de hasta 8 metros que presentan ramas estigmáticas truncadas u obtusas y carentes del penacho más o menos cónico alargado de pelos colectores, densamente cubierto de verrugas, además presenta hojas general mente alternas con lámina y limbo ovado, el ápice es agudo algo redondeado en la base con un margen sinuado-dentada, se presenta algo tomentoso-lanudo en el envés (Díaz-Piedrahíta & Cuatrecasas, 1990). Su peciolo de 10 a 12 cm de largo, presenta inflorescencias terminales, sus flores se presentan en capítulos bien pequeños, no son muy parecidos entre ellos, son elípticos y membranosos, presentan ápice agudo terminal; anteras cada una mide 3 mm de largo (Correa, 2003).

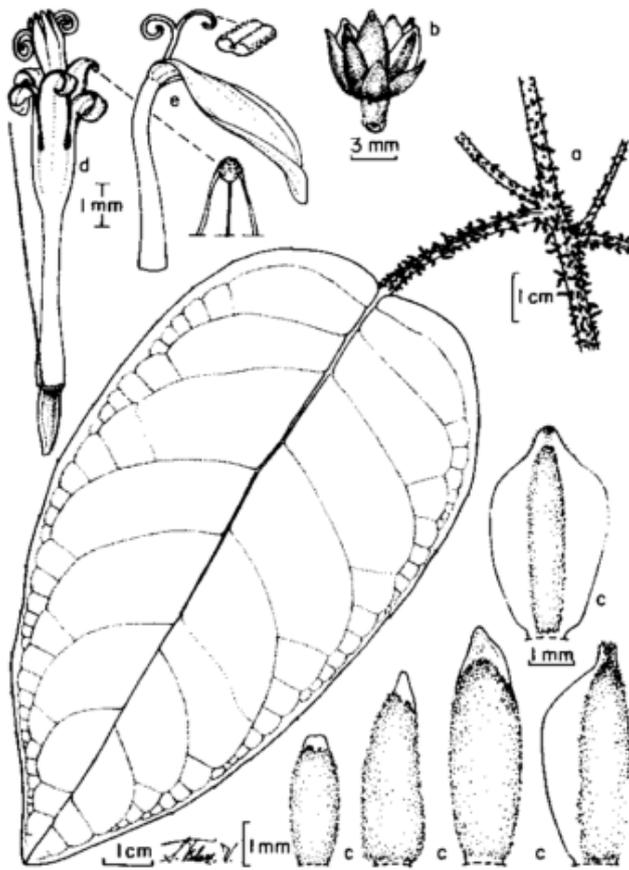


Figura 1 Características de morfológicas *G. verrucosa* Wedd

Fuente: (Díaz-Piedrahíta & Cuatrecasas, 1990)

### 1.1.3. Distribución

*Gynoxys* es un gran género neotropical de más de 100 especies distribuidas en gran parte de la Cordillera de los Andes. Algunas de sus especies han sido descritas por especialistas en varios países como Perú, Colombia, Venezuela (Dillon & Alva, 1988). En lo que respecta a Ecuador, la especie *G. verrucosa* Wedd se la puede encontrar entre los bosques montanos o paramos entre 1500 a 4000 m s.n.m. (Correa, 2003). En base a algunas investigaciones se han podido detectar algunos registros entre las provincias de Loja y Zamora Chinchipec (Tene et al., 2007), sin embargo, cabe mencionar que son pocos los estudios que se han realizado en cuanto a esta especie, razón por la cual aún no se tiene un rango de distribución definido.

### 1.2. Etnobotánica

En Ecuador existe un riquísimo patrimonio etnobotánico, fruto de la intensa relación que las sociedades rurales tradicionales mantenían con su entorno natural (Moya, 2012). A través de los siglos, cada población ha desarrollado sus conocimientos en el reconocimiento, la cosecha, y el uso de plantas para curar enfermedades (De Feo, 2003), simbolizando para

estas comunidades un valor absoluto debido a que representa su sustento diario y a la misma vez forma parte de su mundo espiritual (Pardo & Gómez, 2003).

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 ecología (Minga, 2014). 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* (Tene et al., 2007).

Estudios etnobotánicos han brindado un panorama completo acerca de los remedios naturales que utilizan por los habitantes de las provincias de Loja y Zamora-Chinchipe en el sur Ecuador. Se ha identificado 275 plantas diferentes que presentan varias propiedades medicinales. Del número total de plantas, 152 son nativas, 57 son introducidas, 5 son tradicionalmente cultivadas, y 8 son endémicas (Tene et al., 2007; Andrade et al., 2009).

#### **1.2.1. Usos, propiedades y aplicaciones.**

Las plantas medicinales y alucinógenas han sido tradicionalmente consumidas por los habitantes de estas regiones del Ecuador por siglos. El uso de guayusa, matico, guabiduca, curarina, condurango, entre otras que conforman un aspecto importante de sus tradiciones culturales (Tene et al., 2007); como el caso de rituales mágicos acompañan la prescripción de los remedios vegetales. Las plantas medicinales entran en la “cosmovisión andina”, en las que poseen un benéfico espíritu, que ejerce la cura (De Feo, 2003).

La especie *G. verrucosa* Wedd comúnmente conocida como guangalo (P. Ordóñez et al., 2011; Bailon-Moscoso et al., 2015), 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 piel (Tene et al., 2007). Así también algunas investigaciones fitoquímicas del extracto de las hojas de *G. verrucosa* Wedd presentan resultados prometedores por su elevada capacidad de luchar contra células tumorales leucémicas (Herrera, 2009; Cabrera, 2010; P. Ordóñez et al., 2011; Bailon-Moscoso et al., 2015).

#### **1.2.2. Metabolitos secundarios.**

Las plantas superiores se caracterizan por su habilidad para producir una gran diversidad de metabolitos secundarios, que han servido como modelo para el desarrollo de muchos fármacos de gran interés (Ávalos & Pérez, 2009). Sin embargo, aún existe la necesidad de agentes específicos para curar ciertas enfermedades, tales como el cáncer, las enfermedades

cardiovasculares, parasitarias como la malaria, schistosomiasis, tripanosomiasis, lepra y leishmania o las enfermedades infecciosas resistentes, que aún no tienen un tratamiento adecuado (Flores, 2006). La búsqueda de metabolitos secundarios de origen vegetal involucra una combinación de técnicas botánicas, fitoquímicas, biológicas y moleculares; que juegan un papel importante en el tratamiento de diferentes enfermedades (Cabrera, 2010).

Se ha identificado que *G. verrucosa* Wedd contiene un compuesto interesante llamado Dehydroleucodina (DHL), una lactona, que se ha demostrado que puede prevenir el daño gastrointestinal y posee acción antiinflamatoria (Ordóñez et al., 2011). Según Cabrera, (2013), mediante un ensayo logro determinar que el DHL juega un rol importante como ayudantes en la mejora de tratamiento del cáncer. Igualmente en otro estudio bajo el extracto metanólico de *G. verrucosa* Wedd, se ha observado que presenta actividad citotóxica en líneas tumorales humanas (D-384), siendo una posible fuente de metabolitos secundarios con potencial antineoplásico (Herrera, 2009).

### **1.3. Micropropagación**

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. La micropropagación es una técnica de cultivos *in vitro* que hace posible alcanzar este objetivo. Consiste en potencializar la totipotencia celular (Castillo & Peralta, 2007); dicha característica favorece a desarrollar plantas normales y completas a partir de diferentes explantes, lo que ha permitido desarrollar diferentes estrategias para la conservación de germoplasma utilizando el cultivo de tejidos (J. García, 2013; Nieto & Valdivieso, 2013).

Esta técnica presenta varios usos, entre los que se puede destacar el establecimiento de colecciones de clones, con el fin de conservar los recursos genéticos de muchas especies que están en peligro de extinción (Castillo & Peralta, 2007). La tasa de multiplicación es muy importante en términos de eficiencia, se sabe que algunas especies presentan problemas de reproducción, por tal razón sus poblaciones se ven reducidas, lo que ha llevado a considerar estos métodos (Uerrea Trujillo, Canal, & Monsalve, 2011), sin embargo para poder aplicarlas se debe tener bien claro los objetivos a perseguir (Magaly Castillo & Peralta, 2007).

El mejor desarrollo de los métodos de propagación *in vitro* implica el control de condiciones de asepsia, la selección de un medio artificial que nos garantice un resultado exitoso bajo condiciones ambientales controladas (George, Hall, & Klerk, 2008; Nieto & Valdivieso, 2013). Se ha propuesto 3 pasos fundamentales para micropropagar eficientemente una especie: 1) el establecimiento aséptico del cultivo; 2) su multiplicación; 3) el enraizamiento y la preparación del inóculo para su transplante al suelo (Villamizar, 2014).

### **1.3.1. Germinación *In vitro***

La germinación es el conjunto de fenómenos por los cuales el embrión, que se halla en estado de vida latente dentro de la semilla, reanuda su crecimiento y se desarrolla para formar una plántula (Pérez-Pérez, 2007); este proceso se da bajo control de muchos factores, que juegan un papel importante para la germinación (Deaquiz & Burgos, 2013). Requiere de un buen abastecimiento de agua, energía, una temperatura óptima, buena disponibilidad de oxígeno y una determinada acción de la luz (Cabello, Ruiz, & Devesa, 1998). De igual manera depende de las características de la semilla, tamaño, contenido de sustratos hidratables, permeabilidad de la cubierta seminal, toma de oxígeno, entre otras (Uerrea Trujillo et al., 2011).

En cuanto a la germinación *in vitro* de semillas, se pretende reproducir semillas en frascos de vidrio o plástico, sobre un medio de agar nutritivo que contiene los azúcares y minerales necesarios para que las semillas se adapten germinen y crezcan más rápido (Mayo, Cázares, de la Cruz, & Flores, 2010). El agar nutritivo trata de compensar las limitantes al momento de germinar especies en estado silvestre, como la poca reserva de nutrientes en las semillas, lo cual es un factor limitante para su germinación y supervivencia (Salazar-Mercado, 2012). Esta fase lleva consigo un notable incremento de la actividad mitocondrial, que es influenciada por los factores térmico y lumínico (Perez & Pita, 2001; Mayo et al., 2010; Marasssi, 2013).

### **1.3.2. Métodos de regeneración de plantas.**

Los procesos de embriogénesis somática, y la organogénesis comprenden el desarrollo de yemas o de meristemos radicales a partir de los explantes directamente o a partir de callos; ambos procesos son ampliamente considerados efectivos para la producción masiva de plantas *in vitro* (Calva & Pérez, 2005; Acosta, 2014). Para lo cual se requiere de una secuencia de medios de cultivo, ya que aquellos medios que favorecen el desarrollo de los brotes inhiben la formación de raíces y viceversa (Lizt & Jarret, 1993; Villamizar, 2014). Así también se requiere un suministro de reguladores de crecimiento, como la organogénesis que requiere reguladores de crecimiento de tipo auxina combinados con reguladores de crecimiento de tipo citoquinina (Marconi & Radice, 1997; Rodríguez Beraud, Latsague Vidal, Chacón Fuentes, & Astorga Brevis, 2014), en cambio la embriogénesis se suelen utilizar auxinas y en concreto el 2-4 D (ácido 2-4 diclorofenoxiacético) (Marconi & Radice, 1997; Castellanos et al., 2006; L. R. García et al., 2008). Sin embargo, en cada caso se requiere de unos reguladores en concentraciones que se determinan empíricamente (Lizt & Jarret, 1993; Marconi & Radice, 1997; Acosta, 2014).

### 1.3.3. Medios de cultivo.

Las células requieren una variedad de nutrientes orgánicos e inorgánicos, por tal razón el medio de cultivo debe proveer todos los nutrientes necesarios para su desarrollo en la forma, combinación y concentración requerida (J. García, 2013). Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos que brindaran un aporte fundamental en la micropropagación de plantas (Molina-Cabrera, 2012).

Un medio para el cultivo *in vitro*, está compuesto básicamente por: agua, sales minerales, azúcar, vitaminas y en algunos casos, reguladores de crecimiento macro y micronutrientes y fuentes de carbono; para dar consistencia al medio se suele adicionar agar o gelatina simple (Mroginski, Sansberro, & Flaschland, 2004). El contenido químico del medio de cultivo debe satisfacer las necesidades para garantizar el crecimiento de la planta (George et al., 2008).

En la actualidad existen innumerables formulaciones, cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran (Krikorian, 1993).

Fuente de carbono.- muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, razón por la cual se le agregan fuentes de carbono, como la sacarosa (2-5%), siendo la más utilizada; sin embargo puede ser remplazada por glucosa y en menor medida por fructosa (Krikorian, 1993; Mroginski et al., 2004; George et al., 2008).

Nutrientes minerales.- se deben suministrar los macro y micronutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas enteras. En general, se destacan las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio. El nitrógeno es suministrado en forma de amonio y/o nitrato. También se pueden utilizar en forma orgánica como: glutamina y caseína hidrolizada. Es fundamental que el hierro sea incorporado conjuntamente con un agente quelante (Na<sub>2</sub> EDTA), lo que lo hace disponible en un amplio rango de pH (Krikorian, 1993; Mroginski et al., 2004; George et al., 2008).

Sustancias vitamínicas.- necesarias para la realización del metabolismo normal de ciertos organismos vivos, similar a las enzimas u hormonas que el organismo necesita en cantidades relativamente mínimas para su normal crecimiento y desarrollo. De todas las que comúnmente se incorporan a los medios, pareciera que la tiamina es la única que realmente es imprescindible para el buen crecimiento de los cultivos (Krikorian, 1993; Mroginski et al., 2004 George et al., 2008).

Agente gelificante.- uno de los mejores agentes gelificantes que se dispone para realizar cultivos *in vitro* de tejidos vegetales es el agar, también conocido como agar- agar. Los

gelificantes deben cumplir con los siguientes requisitos: no ser asimilado por el explante, lo que haría que al consumirse el medio retornase a su estado líquido, no interferir en la absorción de los nutrientes del medio de cultivo, y permanecer estable durante el tiempo de cultivo (Krikorian, 1993; Mroginski et al., 2004 George et al., 2008).

Otros compuestos.- Muchas sustancias, de variada composición química, suelen ser adicionadas a los medios básicos. Además de la glicina, otros aminoácidos se pueden agregar a los medios. El carbón activado (0,1 a 5%) suele ser incorporado al medio, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos. En algunos medios se incorporan ácidos orgánicos como el málico, el cítrico, el pirúvico y el succínico (Krikorian, 1993; Mroginski et al., 2004; George et al., 2008).

El medio más comúnmente utilizado es la formulación de Murashige y Skoog (1962), el cual presenta en su formulación la relación amonio:nitrato ( $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ) 1:2. Fue desarrollado para el crecimiento óptimo de callo de tabaco y en el proceso participan un gran número de curvas de dosis-respuesta para los diversos minerales esenciales. Cada especie de planta tiene su propia característica primaria, composición que se puede utilizar para adaptar el medio. Generalmente este medio da como resultado la mejora del crecimiento (Krikorian, 1993; George et al., 2008; González, Mogollón, Alvarado, Giménez, & Capote, 2012).

#### **1.3.4. Reguladores de crecimiento.**

Las hormonas están vinculadas con todas las respuestas que se dan en el proceso morfogénético de las plantas, durante dicho proceso estas hormonas son relativamente escasas en número (George et al., 2008). Por lo que se considera que el crecimiento y desarrollo de las plantas debe estar regulado por ciertas sustancias químicas, que en conjunto, ejercen una compleja interacción para cubrir las necesidades de la planta (Amador et al., 2003).

Se han establecido cinco grupos de hormonas vegetales: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico y sus derivados y, etileno (Jordán & Casaretto, 2006). Estas sustancias están ampliamente distribuidas y se encuentran en forma natural en todas las plantas superiores. Son específicas en cuanto a su acción, ejercen su actividad a muy bajas concentraciones, y regulan el crecimiento de las células, la división y la diferenciación celular, así como la organogénesis, la senescencia y el estado de latencia (Morales, 2000).

Los reguladores de crecimiento, son considerados como moléculas que modifican el crecimiento y desarrollo de las plantas; la concentración en las que se suministre definirá el crecimiento vegetal (Amador et al., 2003). Así también 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 requiere de un suministro externo de estas sustancias para estimular la germinación (Leal, 2003). Dentro de los reguladores del crecimiento más estudiados en lo que se refiere a germinación, se encuentran el ácido giberélico (AG3), auxinas, kinetinas, las cuales se han empleado para estimular la germinación de semillas de diferentes especies (Cárdenas, 2011).

#### *1.3.4.1. Citoquininas.*

Las citoquininas o citocininas constituyen un grupo de hormonas vegetales que promueven la división y la diferenciación celular, la cual se encarga de dar origen a la formación de cada uno de los órganos de cualquier vegetal (Leal, 2003). En algunos ensayos con citoquininas, probablemente no habría diferenciación de órganos vegetales si no se agregan otras hormonas, las auxinas ejercen una acción sinérgica en la inducción de la división celular y el crecimiento de cultivos vegetales (Alban, 2014).

Se ha observado que las mayores concentraciones de citoquininas se encuentran en embriones y frutas en desarrollo; en ambos casos, se observa que sufren una rápida división celular; por ende los altos niveles de la misma facilitan su habilidad para actuar como fuente demandante de nutrientes. Así también, las citoquininas se forman en las raíces y son translocadas a través del xilema hasta el brote (Carrera, 2009). Habitualmente se utilizan estas hormonas en bajas concentraciones para estimular la proliferación de tejidos y en concentraciones más elevadas para desencadenar la neoformación de yemas sobre callos. Entre las más utilizadas se encuentran las purinas sustituidas; la kinetina es la más importante de las citoquininas naturales en cuanto a las artificiales las más importante es la Benzilaminopurina (Chamorro, Martínez, Fernández, & Mosquera, 2007).

Al aplicar citoquinas en forma exógena a las plantas, pueden estimular una serie de procesos fisiológicos metabólicos, bioquímicos y de desarrollo. La principal es la inducción a la división y elongación celular a través del incremento de la plasticidad de las paredes celulares, así también las citoquininas brindan un efecto promotor sobre la síntesis de RNA y enzimas, lo que provoca un incremento en la velocidad de la síntesis de proteínas, algunas de las cuales podrían ser necesarias para la mitosis (Villatoro, 2014).

#### *1.3.4.2. Ácido giberélico.*

Las giberelinas (GAs) son hormonas de crecimiento diterpenoides tetracíclicos involucrados en varios procesos de desarrollo en vegetales. A pesar de ser más de 100 el número hallado en plantas, sólo son unas pocas las que demuestran actividad biológica; como es el caso del

Ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), que fue la primera de esta clase en ser descubierta (Jordán & Casaretto, 2006). El efecto más notable de las GAs es inducir crecimiento en altura, promueven el desarrollo súbito de inflorescencias y la floración en muchas plantas, particularmente en aquellas de día largo, así también inducen la germinación en semillas en condiciones de dormancia (Chamorro et al., 2007; Alban, 2014).

Las giberelinas son sintetizadas en muchas partes de la planta, pero más especialmente en áreas de crecimiento activo, como los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y en semillas en desarrollo. Además de ser encontradas en el floema, también han sido aislados de exudados del mismo, lo que sugiere que presenta un movimiento bidireccional de la hormona en la planta (G. Morales, 2006).

Las giberelinas (GAs) son hormonas que estimulan la síntesis de enzimas hidrolíticas de  $\alpha$ -amilasa, en la capa de aleurona, dicha estimulación provoca una activación de la transcripción de los genes que codifican para un grupo de proteínas. Las amilasas degradan el almidón y los productos de la digestión almacenados en la aleurona y el endospermo almidonoso, que luego son movilizados al escutelo para iniciar el crecimiento de las plántulas (Mandujano, Golubov, & Rojas, 2007). Así también se ha observado que los niveles de Ácido Giberélico en los vegetales están regulados por mecanismos homeostáticos que incluyen cambios en la expresión de una familia de enzimas de inactivación de AG, conocidas como AG-2-oxidasas (González, Caycedo, Velásquez, Flórez, & Garzon, 2007). Con las cuales ayudarían en cumplimiento del rol fisiológico en el desarrollo de las semillas, el desarrollo de la floración, el crecimiento del tubo polínico y la elongación de brotes y tallos. Los cambios en la concentración de la hormona y la susceptibilidad del tejido vegetal influyen en estos procesos. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales las AG son traducidas a cambios morfológicos y bioquímicos dentro de las plantas son desconocidos (Deaquiz & Burgos, 2013).

#### **1.4. Factores que influyen crecimiento *In vitro***

Para el desarrollo adecuado de cultivos *in vitro* deben mantenerse condiciones apropiadas para su mantenimiento, en el cual se pretenda imitar las condiciones naturales más favorables. La luz, temperatura y la humedad relativa son los factores más destacados a considerar (Willan, 1991; Marin, 1997; George et al., 2008; Marasssi, 2013; Rossetti, 2014).

Luz: en necesarias, no tanto para la fotosíntesis de los tejidos que si se originan en baja proporción, sino para la fotomorfogénesis tenga lugar y se produzcan brotes de aspecto normal (Willan, 1991). En la gran mayoría de los casos se estimula la germinación mediante

exposición a luz roja, en esta reacción a condiciones lumínicas está involucrado el fitocromo que aporta al buen desarrollo del embrión (Marin, 1997; Pérez, 2003).

Temperatura: durante el periodo iluminado la temperatura debería estar entre 22-25 grados centígrados, en el interior de los frascos de cultivo es ligeramente superior (1-2 grados) debido al efecto de invernadero, estableciendo un termoperiodo leve a pesar que tenga la temperatura constante en la cámara de cultivo (Willan, 1991; Jordán & Casaretto, 2006; Pérez-Pérez; 2007; Doria, 2010 Marasssi, 2013).

Humedad: se considera una humedad bastante alta, ya que posibilita que se active una serie de procesos metabólicos que son esenciales para que se desarrolle el proceso de germinación (Willan, 1991; George et al., 2008; Piñuela, 2001), a pesar que en su interior sea totalmente hermético, se crea condiciones que permiten cierto intercambio gaseoso, dando un ambiente favorable para el desarrollo y crecimiento (Marin, 1997).

#### **1.4.1. Cuidado en el manejo *In vitro*.**

Con respecto a cultivos de tejidos o germinación *in vitro*, uno de los principales factores que afecta a estos métodos es la contaminación por bacterias y hongos, esto se debe al medio de cultivo en el que se siembra, debido a que es una excelente fuente de nutrientes para el crecimiento de microorganismos, cuya presencia trae como resultado, generalmente, un incremento en la mortalidad de los tejidos, reducción del coeficiente de multiplicación y del enraizamiento de la planta "*in vitro*" (Borges, Estrada, Péres, & Meneses, 2009; Rossetti, 2014).

Estos y otros microorganismos conocidos como ambientales, colonizan al medio de cultivo llegando a cubrir totalmente la superficie del medio, provocando clorosis y necrosis del tejido y finalmente la muerte de las plantas (Carrazana et al., 2006; Borges et al., 2009; Jácome, 2011). Para evitar esto es necesario, trabajar en ambientes adecuados; esterilizar los medios de cultivos más comúnmente en autoclave a una presión de 15 lb. Durante 15 a 20 minutos; a esta presión la temperatura del vapor es aproximadamente 121 °C, suficiente para matar virtualmente todas las formas de vida; así un adecuado manejo de asepsia al desinfectar los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos; y realizar los cultivos con ciertas normas de asepsia (Recalde, 2007; Santos, 2011; Vargas, 2012).

## **1.5. Objetivos**

### **1.5.1. Objetivo general**

- Evaluar reguladores de crecimiento vegetal en la disminución del tiempo hasta la germinación de *G. verrucosa* Wedd.

### **1.5.2. Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de la kinetina y el AG<sub>3</sub> en la aceleración de la germinación de *G. verrucosa* Wedd
- Obtener individuos sanos a partir de la germinación *in vitro*.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. 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.

### **2.2. 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.

### **2.3. Desinfección de las semillas.**

Con las semillas colectadas se realiza un proceso inicial, 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 en temperatura ambiente, para luego ser desinfectadas (Anexo 1).

Existen diferentes métodos de desinfección previa a la siembra de semillas. Cada uno de ellos se basan en la esterilización de las semillas y el lavado en agua destilada antes de sembrarlas, sin embargo las técnicas varían (Salas-Salmeron, 2007). El tiempo de esterilización también varía dependiendo de la especie, del tiempo de maduración luego que la semilla es colectada, de las condiciones climáticas a momento de la colección y de los métodos de secado y almacenamiento. Por ello, un rango de tiempos de esterilización es recomendado para las nuevas semillas (McKendrick, 2000; George et al., 2008).

Para el mejor manejo de las semillas de *G. verrucosa* Wedd, se fusionó el protocolo planteado por George et al. (2008) y Schmidt, (2000); estos métodos han reportado buenos resultados. Se los modificó utilizando una concentración de 10 Vol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alcohol al 70% e hipoclorito al 20%.

Posteriormente se realiza la esterilización (Anexo 2), la cual 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 (McKendrick, 2000; George et al., 2008).

### **2.3.1. Tratamiento de la semilla.**

Según (Feijo, Iglesias, & Rodríguez-Oubiña, 2000; Schmidt, 2000; George et al, 2008); el presente estudio se desarrolló a partir de tratamientos con reguladores de crecimiento como: kinetina (Kin) (citoquininas) (100-200-300 ppm) y ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) (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.

### **2.4. Siembra.**

El medio de cultivo *in vitro* utilizado es el Murashigue & Skoog, 1962, el cual se prepara sin suplementos. En dosis de 4,3g/l, según las especificaciones del fabricante, más 7g/l de agar y 20g/l de azúcar (Schmidt, 2000; George et al. 2008;). Cada uno de estos se los vierte en un litro de agua destilada, se agita en un agitador magnético, hasta obtener una disolución homogénea; se mide el pH en un potenciómetro, el cual debe estar entre 5,7 y 5,8; por último se coloca el medio en pequeños frascos no sellados herméticamente, para ser llevados a autoclavar para su esterilización.

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 Murashige y Skoog, 1962 (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.

### **2.5. 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 (AG<sub>3</sub>) 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.

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

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

Fuente: Cueva, J 2016.

## 2.6. Análisis estadístico.

En una matriz de Microsoft Excel se organizó cada uno de los datos obtenidos en cada uno de los ensayos de réplica en la siembra *in vitro*, en donde 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 que tiempo de exposición.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1. 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 (Anexo 3).

Tabla 2. Síntesis de resultados de germinación.

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 <sub>3</sub>	24H	18	41	5
AG <sub>3</sub>	12H	13	33	0
AG <sub>3</sub>	6H	11	26	0

Fuente: Cueva, J 2016.

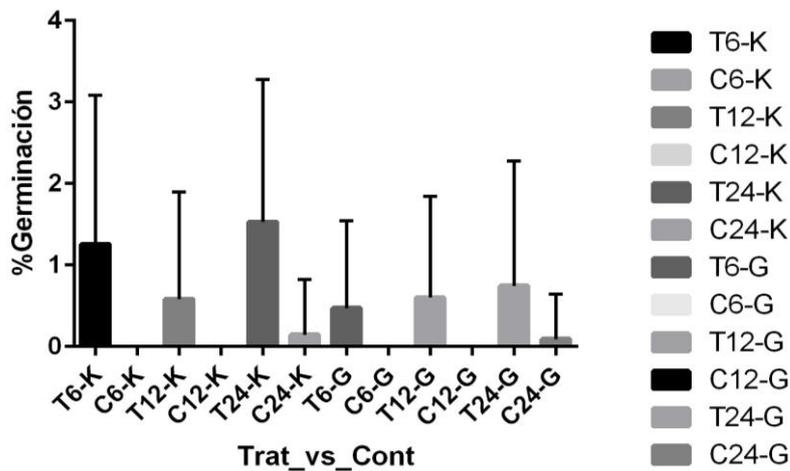


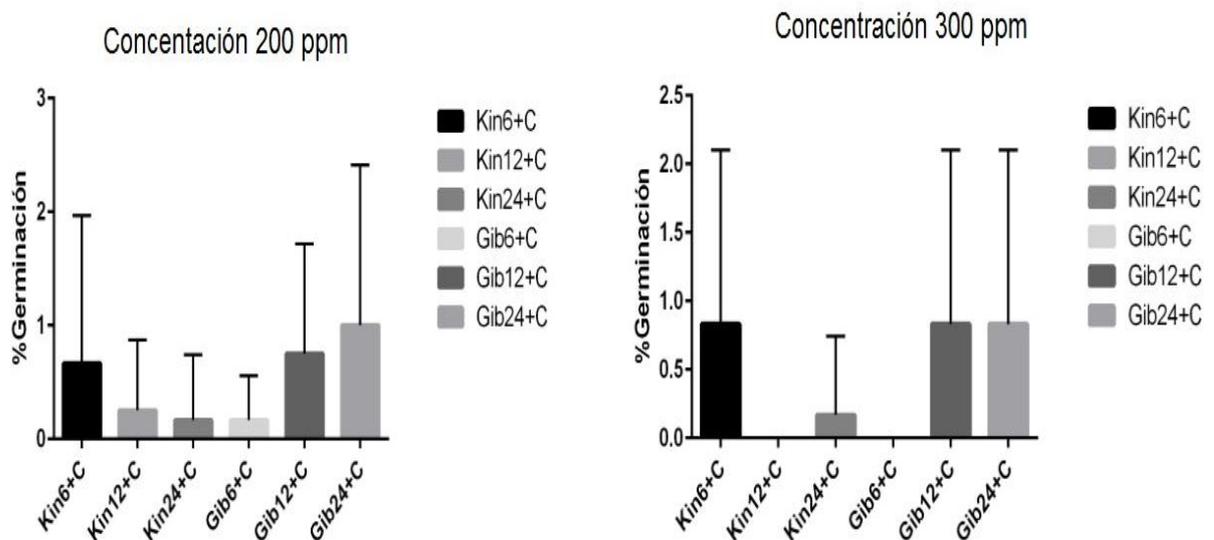
Figura 2. Comportamiento de los tratamientos frente a sus controles

Fuente: Cueva, J 2016.

Normalmente se ha observado que los frascos control o blanco mostraron baja germinación; los pocos frascos que germinaron fue en 25 días. La figura 2, 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 Barteltt, basadas en las medias y la varianza de nuestros datos no arrojan un  $P < 0.05$ , con lo cual podemos definir que existe diferencias significativas, ya sea en los tratamientos frente a su 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.

Figura 3. Respuesta de germinación con aumento de concentración de 200 y 300 ppm.

Fuente: Cueva, J 2016.



Al evaluar una mayor concentración de reguladores, en la figura 3, 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 concentraciones 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 AG<sub>3</sub>, que se observa respuesta germinativa con 200 y 300 ppm.

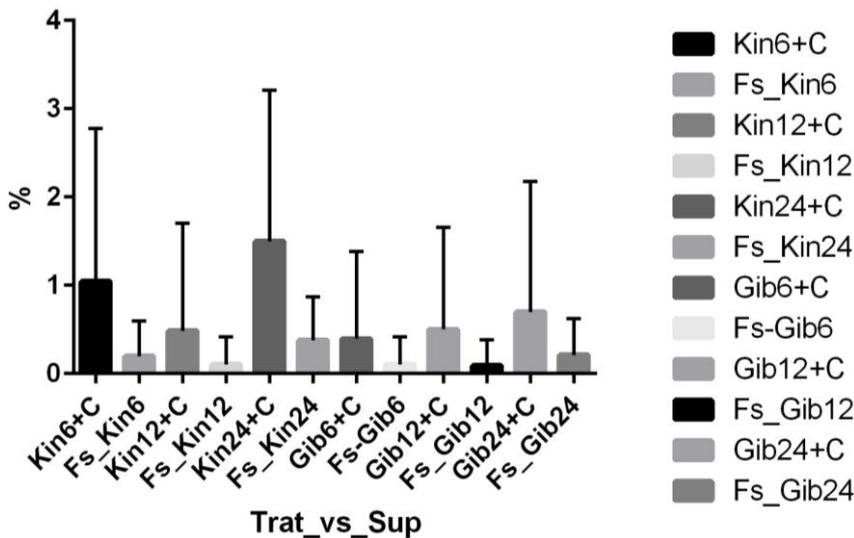


Figura 4. Evaluación de la supervivencia (Tratamientos frente a la supervivencia).

Fuente: Cueva, J 2016.

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 evalúalo a cada individuo que sobrevivió.

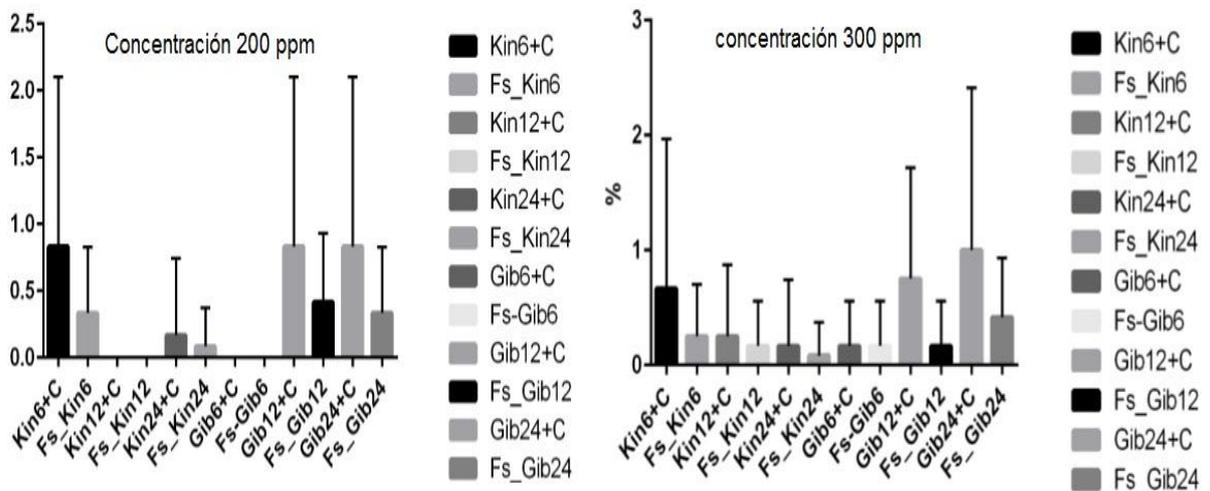


Figura 5. Tratamientos frente a la supervivencia en concentración de 200 y 300 ppm.

Fuente: Cueva, J 2016.

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  $AG_3$ , gran parte de los individuos que germinaron si logran sobrevivir; se apreció el mismo patrón en las concentraciones de 200 y 300 ppm, figura 5 en donde se corrobora que  $AG_3$  responde mejor a la supervivencia.



Figura 6. Formación de callos, el primero con KIN 24h y el segundo de  $AG_3$  24h.

Fuente: Cueva J. 2016

Como una respuesta positiva de los individuos que sobrevivieron, tomando en cuenta que no fue parte del cumplimiento de los objetivos; en la figura 6, 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  $AG_3$ .

### 3.2. Discusión

Los resultados obtenidos nos han permitido determinar la efectividad de los reguladores de crecimiento, en cuanto a la aceleración de 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% (Baskin & Baskin, 1998). 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 (Basto & Ramírez, 2015).

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 (García-Fayos et al., 2001; Dalling, 2002; Wehncke & Dalling, 2005). Lo que provoca el deterioro de las semillas, por lo que la calidad de la semilla se ve afectada por daños mecánicos, humedad de la semilla, patógenos y muchos otros factores que afectan a la recuperación de la semilla (Mng'omba, du Toit, & Akinnifesi, 2007).

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 germinación (Feijóo et al., 2000; Schmidt, 2000).

Según George et al, (2008), 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 ( $AG_3$ ), pero en la actualidad se han visto resultado prometedores con Citoquininas (Kimetina).

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 contaminación (Ochoa, 2015). 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 menciona Verma, Ravindran, & Kumar, (2016), en algunos ensayos realizados con kinetinas (KIN), muestran una mejor respuesta al estrés biótico; debido a que éstas promueven respuesta de defensas al momento de germinar, lo que favorece a la activación de la semilla (Swartzberg, Hanael, & Granot, 2011); de igual manera lo comprobó Nikolic, Mitic, Zivkovic, Grubisic, & Neskovic, (2007) que argumenta que las KIN ejercen su acción principalmente en las semillas que están bajo condiciones de estrés.

No obstante el efecto de AG<sub>3</sub> también respondió de una manera positiva, de cual se obtuvo resultados en 17 días, y de igual manera son efectivas en semillas que sufren condiciones de estrés o latencia (Dimalla & van Staden, 1977). 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 (Deaquiz & Burgos, 2013; Mandujano et al., 2007). 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* (Borrero, 2007; Mandujano et al., 2007; Gómez-Matínez, Reyes-Valdes, Martínez-Reyna, Escobedo-Bocardo, & García-Osuna, 2010).

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 germinación (Zárate, Cantos, & Troncoso, 1997; Amador-Alfárez, Díaz-González, Loza-Cornejo, & Bivián-Castro, 2002; Saucedo, Ramos, & Reyes, 2008).

Consecuentemente al evaluar la supervivencia se observa que se da un proceso antagónico con las KIN, lo que no sucede con AG<sub>3</sub>; se considera que esto es por el medio (MS) que se utilizó, pues tenía algunos años y con esto la composición de los nutrientes en el medio conforme avanza el tiempo se ve afectada (Bonga & Von Aderkas, 1992); tomando en cuenta que algunos nutrientes se eliminan a una mayor velocidad que otros, por lo que las concentraciones de amonio: nitrato en el medio no son las mismas, afectando con esto a los tejidos en crecimiento ( Bonga & Von Aderkas, 1992; Molina-Cabrera, 2012).

Se señala para obtener una mayor viabilidad en la supervivencia de las semillas, hay que considerar evaluar factores como la temperatura, luz humedad (Villalobos, Herrera, & Guevara, 1992); debido a que son estos los activan o desactivan a los RCV; Hernández et al. (2009), definió que existe mayor supervivencia en condiciones de luz y oscuridad, ya que estas permiten la activación del metabolismo de las AG<sub>3</sub>, lo que favorece a la supervivencia a las plantas que fueron inducidas con este RCV.(Borrero, 2007; Mandujano et al., 2007; Gómez-Matínez et al., 2010).

Por otro lado, las condiciones manejadas *in vitro* como la humedad de los frascos en los que se sembraron, así también el periodo de luz al que estuvieron sometidas las semillas, fueron las adecuadas ya que 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 (J. García, 2013).

A pesar que el suministro de los reguladores de crecimiento se aplicó de manera externa, a la semilla, antes del inicio del cultivo *in vitro*, se podría decir que fueron esenciales para el desarrollo de los callos (Córdova, Cobos, Imán, & Castro, 2014); tomando en cuenta que en la mayoría de estudios el suministro de hormonas se realiza directamente al medio de cultivo (Escandón et al., 2003). Hay que presente tener que el estudio solo se evaluó hasta este punto, por consiguiente queda la oferta abierta, para el desarrollo de las etapas faltantes, debido al éxito de esta investigación.

## CONCLUSIONES

La micropropagación representa una herramienta efectiva para trabajar con especies que presentan un comportamiento complejo. Es decir *G. verrucosa* Weed, en tanto *Asteraceae* adopta la estrategia de producir gran cantidad de semillas con porcentajes bajos de germinación y al mismo tiempo el comportamiento de su semilla se ha revelado como recalcitrante. Contribuyendo con esto a un mejor entendimiento de *G. verrucosa* Weed.

La aplicación de los reguladores de crecimiento favoreció de manera positiva en cuanto a la aceleración de germinación, obteniendo una respuesta de 15 días con Kinetinas con un 60% de germinación y a los 17 se observó 40 % de germinación con Giberelinas.

Aparentemente se podía considerar que fue un porcentaje bajo de germinación ya que sus semillas fueron seleccionadas directamente de sus sitios naturales, además *G. verrucosa* Weed posee la característica de producir un gran número de semillas; sin embargo hay que tener

presente que 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 permitiendo a los reguladores de crecimiento responder de mejor manera.

Posiblemente la supervivencia de las plántulas no tiene nada que ver con los tratamientos; si no con las condiciones *in vitro*, es decir la misma influencia del medio de cultivo y sus concentraciones en sales nutricionales, fotoperiodo, temperatura y humedad. Cada uno de estos factores juega un papel fundamental en los procesos interno de los tejidos

## RECOMENDACIONES

Se debe promulgar e incentivar el desarrollo de investigaciones con especies medicinales debido al gran aporte científico, cultural y económico que éstas ofrecen. Dado que la información es escasa, en muchas de las especies medicinales, lo que ha venido siendo un factor negativo para algunos estudios.

Debido a que en *G. verrucosa* Weed aún existen discrepancias en cuanto a la taxonomía de esta especie, se recomienda hacer realizar estudios en cuanto a su ecología y taxonomía, para facilitar una mejor comprensión.

Para tener éxito en nuestros resultados al momento de trabaja cultivos *in vitro*, se recomienda realizar adecuadamente los protocolos desinfección, cumplir con los tiempos de exposición al momento de aplicar los reguladores de crecimiento; en las cabinas de flujo laminar durante la

siembra es importante después de 15 min desinfectar la cabina con alcohol y así evitar la contaminación.

A pesar que aún no existe una concentración adecuada para trabajar con especies forestales, tomando en cuenta los resultados que se obtuvieron en cuanto a la aplicación de los reguladores de crecimiento, 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.

Es importante continuar con las fases faltantes de este estudio ya que los resultados obtenidos hasta el momento garantizan el éxito de esta técnica; razón por la cual, es conveniente aplicar estudios *ex situ*, que aporten a su conservación o a su vez los individuos obtenidos sirvan para la obtención de metabolitos secundarios.

### Bibliografía

- Acosta, C. (2014). La micropropagación en especies forestales. *Ciencia Actual*, 24(2), 285–305. <http://doi.org/10.1056/NEJMra1313875>
- Alban, E. (2014). “ *EVALUACION DE LA EFICACIA DE CITOQUININA ( CYTOKIN ) Y UN INDUCTOR CARBÓNICO ( CARBOROOT ) EN TRES DOSIS Y EN DOS ÉPOCAS EN EL RENDIMIENTO DE BANANO DE VARIEDAD GRAN ENANA , CANTÓN QUININDE DE LA PROVINCIA DE ESMERALDAS. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.*
- Amador, K., Díaz, J., Loza, S., & Egla, 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.
- Amador-Alfárez, K. A., Díaz-González, J., Loza-Cornejo, S., & Bivián-Castro, E. Y. (2002). EFECTO DE DIFERENTES REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE DOS

- ESPECIES DE FEROCACTUS (CACTACEAE). *Polibotánica*, 35, 109–131.
- Andrade, J M., Armijos Ch., Malagón O., & Lucero H. (2009). Plantas medicinales silvestres empleadas por la etnia Saraguro en la Paroquia San Lucas, Loja-Ecuador: Ediciones UTPL . pag 64.
- Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145. Retrieved from <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/798/814>
- Bailon-Moscoso, 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>
- 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>
- Basto, S., & Ramírez, C. (2015). Effect of light quality on *Tabebuia rosea* (Bignoniaceae) seed germination. *Universitas Scientiarum*, 20(2), 191–199. <http://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-2.elqt>
- Benenaula, M. (2007). *PROPAGACIÓN VEGETATIVA INDUCIDA CON 3 BIOREGULADORES DE CRECIMIENTO DE Buddleja sp. Y Gynoxys cuicochensis. Dspace.Uazuay.Edu.Ec*. Universidad del Azuay. Retrieved from <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/3281/1/10055.pdf>
- Bonga, J. M., & Von Aderkas, P. (1992). *In vitro culture of trees*. (Vol. 38). Springer Science & Business Media. Kluwer Academic Publishers.
- Borges, M., Estrada, E., Péres, I., & Meneses, S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de *Dioscorea alata* L . clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 127–135.
- Borrero, E. (2007). *Protocolo para la Regeneración de Plántulas a partir de Explantes de Hojas de Cinco Variedades Ecuatorianas de Tomate de Árbol (Solanum betaceum)*. UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO.
- Brandbyge, J. (1991). Reforestación de los andes ecuatorianos con especies nativas. *CESA - Intercooperation Suiza*, 1–79. Retrieved from [http://www.rrdredlatina.info/biblioteca/ECES\\_REFORESTACION\\_ANDES\\_completo.pdf](http://www.rrdredlatina.info/biblioteca/ECES_REFORESTACION_ANDES_completo.pdf)
- Cabello, M., Ruiz, T., & Devesa, J. (1998). Ensayos de germinación en endemismos ibéricos. *Acta Botánica Malacitana*, 23(January 2016), 59–69. Retrieved from <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/2497>
- Cabrera, H. (2010). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DE LAS MOLÉCULAS: ACETATO DE B-AMIRINA Y DEHIDROLEUCODINA, MEDIANTE EL ENSAYO CBMN EN LINFOCITOS HUMANOS. Previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico*. UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA.

- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), 1–16. Retrieved from <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a.htm>\nResumen\nhttp://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r102683.PDF
- 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.
- Carrazana, D., Herrera, L., Franco, C., García, M., Delgado, M., & Ramos, N. (2006). *Bacillus subtilis* , contaminante bacteriano en micropropagación de bananos (cv . FHIA-18 , AAAB). *Jardín Botánico de Villa Clara*, 3(3), 25.
- Carrera, J. (2009). “*EVALUACIÓN DEL EFECTO DE BIORREGULADORES SOBRE LA CALIDAD Y TAMAÑO DEL FRUTO DE NARANJILLA (Solanum quitoense) EN LA LOCALIDAD DE NANEGALITO.*” ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO.
- Castellanos, O., Rodríguez, A., Rodríguez, J., & Rodríguez, B. (2006). ORGANOGÉNESIS INDIRECTA Y ENRAIZAMIENTO in vitro DE *Paulownia elongata*. *E-Gnosis*, 4(1), 0.
- Castillo, M., & Cueva, D. (2006). *Propagación a nivel de invernadero y estudio de regeneración natural de dos especies de podocarpaceas en su hábitat natural*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA.
- Castillo, M., & Peralta, C. (2007). *ESTADO DE CONSERVACIÓN, PROPAGACIÓN ASEJUAL Y SEXUAL EN INVERNADERO Y LABORATORIO DE DOS ESPECIES DE PODOCARPACEAS, PROCEDENTES DE LA RESERVA COMUNAL ANGASHCOLA*. Univesidad Nacinal de Loja.
- Chamorro, A. H., Martínez, S. L., Fernández, J., & Mosquera, T. (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento in vitro de *Limonium* vas. *Misty blue*. *Agronomia Colombiana*, 25(1), 47–53.
- Córdova, A. M., Cobos, M., Imán, S. A., & Castro, J. C. (2014). Un método eficiente para la inducción de callos in vitro en *Myrciaria dubia* ( Kunth ) Mc Vaugh “ Camu Camu .” *Scientia Agropecuaria*, 5, 25–34.
- Correa, A. (2003). Revision of the genus *Paragynoxys* (Asteraceae, Senecioneae–Tussilagininae). *Brittonia*, 55(2), 157–168. [http://doi.org/10.1663/0007-196X\(2003\)055\[0157:ROTGPA\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1663/0007-196X(2003)055[0157:ROTGPA]2.0.CO;2)
- Dalling, J. (2002). Ecología de semillas. *Ecología Y Conservación de Bosques Neotropicales.*, 345–375.
- De Feo, V. (2003). Ethnomedical field study in northern Peruvian Andes with particular reference to divination practices. *Journal of Ethnopharmacology*, 85(2-3), 243–256. [http://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00017-5](http://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00017-5)
- Deaquiz, Y., & Burgos, Y. (2013). EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GIBERELINAS ( GA 3 ) SOBRE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE TOMATE ( *Solanum* EFFECT OF THE

- APPLICATION OF GIBBERELLIN ( GA 3 ) ON TOMATO SEED. *Conexión Agropecuaria JDC*, 3(2), 29–36.
- Díaz-Piedrahíta, S., & Cuatrecasas, J. (1990). EL GENERO AEQUATORIUM NORD. (SENECIONEAE-ASTERACEAE) EN COLOMBIA. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 17(67)(0370-3908), 1–8.
- Dillon, M. O., & Alva, A. S. (1988). Additions to South American Senecioneae (Asteraceae). *Brittonia*, 40(2), 221. <http://doi.org/10.2307/2807010>
- Dimalla, G. G., & van Staden, J. (1977). The Effect of Temperature on the Germination and Endogenous Cytokinin and Gibberellin Levels of Pecan Nuts. *Plant Physiol*, 60(2), 218–221. [http://doi.org/10.1016/S0044-328X\(77\)80061-5](http://doi.org/10.1016/S0044-328X(77)80061-5)
- Doria, J. (2010). Revisión bibliográfica. Generalidades sobre las semillas: su producción , conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 74–85. [http://doi.org/10.1016/S0168-6496\(98\)00035-X](http://doi.org/10.1016/S0168-6496(98)00035-X)
- Escandón, A. S., Ferrari, P., Facciuto, G., Soto, S., Hagiwara, J. C., & Acevedo, A. (2003). Combinación de técnicas in vitro y ex vitro para la micropropagación de Santa Rita (Hibr.). Una arbustiva de relevancia ornamental. *Revista de Investigaciones Agropecuaria*, 32(1), 111–122. Retrieved from C:\Mis documentos\Investigaci\Micropropagacion\Escandon-03-Santa Rita.pdf
- Feijóo, M. C., Iglesias, I., & Rodríguez-Oubiña, J. (2000). CONTRIBUCIÓN A LOS ESTUDIOS DE CONSERVACIÓN DE LEUCANTHEMUM GALLAECICUM RODR.- OUBIÑA & S. ORTIZ, 19, 113–119.
- Flores, E. (2006). *Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género Piper de la flora boliviana*. Universidad Mayor de San Andrés.
- García, J. (2013). “*Establecimiento de un sistema de regeneración in vitro de Cempaxúchitl (Tagetes erect) vía organogénesis indirecta.*” Universidad Autónoma De Querétaro.
- García, L. R., Collado, R., Bermúdez-caraballos, I., Veitía, N., & Torres, D. (2008). Regeneración de plantas vía organogénesis directa en Phaseolus. *Biotecnología Vegetal Vol.*, 8(2), 109–114.
- García-Fayos, P., Gulias, J., Martínez, J., Marzo, A., Melero, J., Traveset, A., ... Medrano, H. (2001). *Bases ecológicas para la recolección, almacenamiento y germinación de semillas de especies de uso forestal de la Comunidad Valenciana*. (P. García-Fayos, J. Gulias, J. Martínez, A. Marzo, J. Melero, A. Traveset, ... H. Medrano, Eds.) (Banc de LI). Valencia: Banc de Llavors forestals. <http://doi.org/SRBMAN007>
- George, E. F., Hall, M. a., & Klerk, G.-J. De. (2008). *Plant Propagation by Tissue Cutlure 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)
- Gómez-Matínez, M., Reyes-Valdes, M. ., Martínez-Reyna, J. ., Escobedo-Bocardo, L., & García-Osuna, H. (2010). Rescate de embriones en híbridos intergenéricos Hellanthus Annuus x Titthonia rotundifolia. *Acta Botanica Mexicana*, 93, 111–119.

- González, M., Caycedo, C., Velásquez, M., Flórez, V., & Garzon, M. (2007). Efecto de la aplicación del ácido giberélico sobre el crecimiento de FROLÀRU Brassica oleraceae L.) var . Botrytis DC. *Revista Agronomía Colombiana*, 25(1), 54–61.
- González, M., Mogollón, N., Alvarado, G., Giménez, A., & Capote, T. (2012). EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO IN VITRO Y LA FUENTE NITROGENADA SOBRE EL CRECIMIENTO DEL COCUY ( Agave cocui TRELEASE ). *Bioagro*, 24(1), 39–44.
- 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 Técnica Particular de Loja.
- Jácome, A. (2011). *MICROPROPAGACIÓN in vitro DE LA ESPECIE ENDÉMICA: JIGUERÓN (Aegiphila ferruginea), PARA LA PRODUCCIÓN MASIVA Y CONSERVACIÓN DE ESTA ESPECIE EN PELIGRO DE EXTINCIÓN*. ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO CARRERA.
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). Capítulo XV Hormonas y Reguladores del Crecimiento : Auxinas , Giberelinas y Citocininas. In *Fisiología Vegetal* (F.A. Squeo, pp. 1–28). La Serena- Chile: Universidad de La Serena.
- Krikorian, A. D. (1993). Medios de Cultivo: Generalidades, composición y preparación. In *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones* (Departnet ).
- Leal, C. (2003). *Organogénesis in vitro a partir de discos de hoja Passiflora mollissima HBK Bailey (curuba) infectados con Agrobacterium tumefaciens*. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA.
- Lizt, R. E., & Jarret, R. L. (1993). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis. In W. Roca & L. Mroginski (Eds.), *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones* (Centro Int, pp. 144–157). Colombia.
- Malagón, O. (2015). *Estudios para colección, conservación y aprovechamiento de especies vegetales de interés medicinal en la región Sur del Ecuador*. LOJA.
- 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.
- Marassi, M. (2013). *Germinación de semillas. Cátedra de Fisiología Vegetal*. (A. Courtis, Ed.) (UNNE/FaCEN).
- Marconi, P. L., & Radice, S. (1997). Organogenesis and somatic embryogenesis in *Codiaeum variegatum* (L.) blume cv. Corazon de Oro". *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 33(4), 258–262.
- Marin, J. A. (1997). La micropropagación y la mejora de especies frutales. *Academia de Zaragoza*, 23, 1–35.
- Mayo, A., Cázares, J., de la Cruz, E., & Flores, A. (2010). Germinación in vitro de Semillas y

- Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco. *Revista de Ciencias de La Vida*, 20(2), 32.
- McKendrick, S. (2000). Manual Para La Germinacion in Vitro De Orquideas. *Ceiba Foundation for Tropical Conservation*, 17.
- Minga, D. (2014). *Relación Entre Conocimiento Tradicional Y Diversidad De Plantas En El Bosque Protector Aguarongo Azuay Ecuador*. Universidad Politécnica Salesiana.
- 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>
- Molina-Cabrera, J. (2012). “Evaluación de cinco medios de cultivo (Phytamax, Murashige Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) y tres dosis de auxina y citoquinina para la germinación de semilla en *Compartmentia speciosa* Rchb.f.” Tesis. Universidad de Cueva.
- Morales, G. (2006). *Reguladores de crecimiento de tipo orgánico en la producción de calabacita (Cucúrbita pepo): (variedad Zucchini Grey) bajo invernadero*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO.”
- Morales, M. (2000). *Inducción de germinacion, crecimiento de plántulas y cultivo in vitro de pitahaya Hylocereus undatus (Haworth)*. Universidad Autonoma de Nuevo Leon.
- Moya, G. (2012). *Etnobotánica De Las Comunidades De Puerto Bolívar, Tarapuya, Aboquëhuira Y Sototsiaya De La Nacionalidad Siona, Provincia Sucumbios, Ecuador*. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD.
- Mroginski, L., Sansberro, P., & Flaschland, E. (2004). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal* (p. 353).
- Musiał, K., & Kościńska-pająk, M. (2013). Ovules anatomy of selected apomictic taxa from Asteraceae family. *Modern Phytomorphology*, 3, 35–38.
- Nieto, V., & Valdivieso, M. (2013). *ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE REGENERACIÓN in vitro Y ACLIMATACIÓN PARA Fuchsia pilaloensis Y Fuchsia hybrida PARA SU CONSERVACIÓN*. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO.
- 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>
- 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.
- Ordóñez, L., Aguirre, N., & Hofstede., R. (2001). Semillas Forestales Andinas Del Ecuador. *Ecosistemas Tropicales ECOPAR*, 48.
- 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>
- Pardo, M. y Gómez, E. (2003). Etnobotánica: aprovechamiento tradicional de plantas y patrimonio cultural. *Anales Del Jardín Botánico de ...*, 60(1), 171–182. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/306731.pdf>
- Pérez, F. (2003). Germinación y Dormición de Semillas. *Material Vegetal de Reproduccion; Manejo, Conservacion Y Tratamiento*, 230.
- Perez, F., & Pita, J. (2001). Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. *Hojas Divulgadas*, Num. 2112 , 16.
- Pérez-Pérez, C. (2007). GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Mimosa aculeaticarpa* var. *biuncifera* (Benth) Barneby (Fabaceae). UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO.
- Piñuela, J. (2001). Efecto de la pérdida de humedad en la germinación de semillas de alupay (*Euphoria didyma* Blanco). EL ZAMORANO- Honduras.
- Quero, A., Enríquez, J., Morales, C., & Miranda, L. (2010). Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales. Revisión. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 1(1), 25–42.
- Recalde, C. (2007). *Establecimiento del cultivo IN VITRO y aclimatación en invernadero de nepeta hederacea variegata , Tabacundo – Pedro Moncayo , 2006*. ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO.
- Rodríguez Beraud, M. M., Latsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., & Astorga Brevis, P. K. (2014). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 21–22. <http://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
- Rossetti, S. (2014). *Análisis de factores que afectan la germinación de semillas de Panicum coloratum*. Universidad Católica de Argentina.
- Salas-Salmeron, F. (2007). *Selección in vitro de plantas tolerantes a plomo para su uso en fitorremediación. Laboratorio de residuos sólidos*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Salazar-Mercado, S. A. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). *Acta Agronomica*, 61(1), 69–78.
- Santos, A. (2011). UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA Escuela de Ciencias Biológicas y Ambientales MODIFICACIÓN DE NUTRIENTES Y AGENTES OSMÓTICOS SOBRE LA LIMITACIÓN DEL CRECIMIENTO In vitro DE *Cinchona officinalis* , L .: Autor Adriana Patricia Santos Díaz. UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA.
- Saucedo, S., Ramos, L., & Reyes, T. (2008). Efecto de los Reguladores de Crecimiento para la Propagación in vitro de la Malanga ( *Xanthosoma sagittifolium* ( L ) Schott ). *Ciencia Y Tecnologia*, 1(L), 17–21.

- Schmidt, L. (2000). Dormancy and Pretreatment. In *Guide to Handling to Tropical and Subtropical Forest Seed* (pp. 1–40).
- Swartzberg, D., Hanael, R., & Granot, D. (2011). Relationship between hexokinase and cytokinin in the regulation of leaf senescence and seed germination. *Plant Biology*, 13(3), 439–444. <http://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00376.x>
- 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-Chinchi, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 63–81. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.032>
- Uerrea Trujillo, A., Canal, A., & Monsalve, Z. (2011). MICROPROPAGACIÓN E INDUCCIÓN DE ÓRGANOS DE ALMACENAMIENTO en CURCUMA LONGA L. *Actual Biol*, 33(94), 5–15.
- Vargas, D. (2012). *Establecimiento de un protocolo para el cultivo in vitro de semillas de Cattleya violacea*. UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL.
- 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>
- Villalobos, R., Herrera, J., & Guevara, E. (1992). GERMINACION DE LA SEMILLA DE PEJFIAYE (*Bactris gasipaes*). II. RUPTURA DEL REPOSO I. *Agronomia Costarricense*, 16(1), 61–68.
- Villamizar, E. (2014). *ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO in vitro PARA EL ESTABLECIMIENTO DE ENCENILLO (Weinmannia tomentosa H.B. & K.) Y DE RODAMONTE (Escallonia myrtilloides L.F) EN EL LABORATORIO DE CULTIVOS DE TEJIDOS DEL JARDÍN BOTÁNICO JOSÉ CELESTINO MUTIS. Igarss.*  
ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO in vitro PARA EL ESTABLECIMIENTO DE ENCENILLO (*Weinmannia tomentosa* H.B. & K.) Y DE RODAMONTE (*Escallonia myrtilloides* L.F) EN EL LABORATORIO DE CULTIVOS DE TEJIDOS DEL JARDÍN BOTÁNICO JOSÉ CELESTINO MUTIS. EDISSON ANDRES VIL.
- Villatoro, E. (2014). *EFEECTO DE LA CITOQUININA (CPPU) SOBRE EL CUAJE Y RENDIMIENTO DE MINISANDÍA (Cytrullus lannatus, Cucurbitaceae); ESTANZUELA, ZACAPA. UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR. UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR.*
- Wehncke, E., & Dalling, J. (2005). Post-Dispersal Seed Removal and Germination Selected Tree Species Dispersed by *Cebus capucinus* on Barro Colorado Island, Panama. *Biotropica*, 37(1), 73–80.
- Willan, R.L., Bonner, F.T., Vozzo, J.A., Thomson, J.R., Chin, H.F., Enoch, I.C., & Glosling, P. G. (1991). A guide to forest seed handling with special reference to the tropics. Guide de manipulation des semences forestières dans le cas particulier des régions tropicales. Guía para la manipulación de semillas forestales con especial referencia a los trópicos (No. FAO FP-20/2). FAO, Roma (Italia).
- 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.

**ANEXOS**

**Anexo 1. Proceso de selección de semillas para la siembra**



**Inflorescencia**



**Aquenios**



**Semillas para la siembra**

**Anexo 2. Protocolo de desinfección**



**Tratamientos de desinfección**

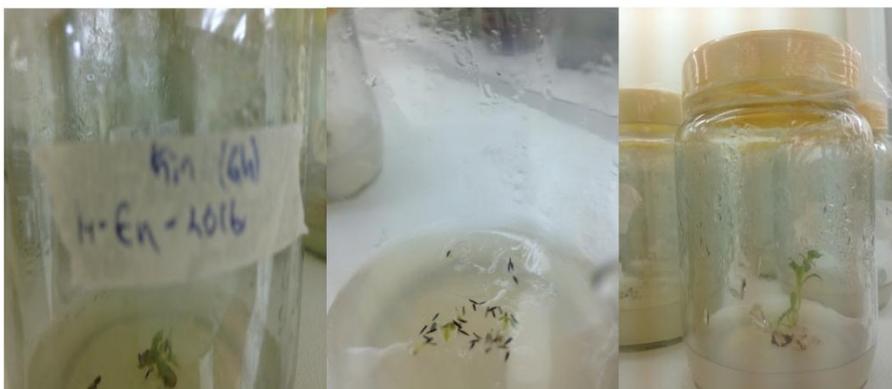


**Enjuague de semillas**



**Aplicación de reguladore de crecimiento**

**Anexo 3. Obtención de la germinación en cada tiempo de expiación con su respectivo regulador de crecimiento**



**KIN 6h**

**KIN 12h**

**KIN 24h**



**AG3 6h**

**AG3 12h**

**AG3 24h**