



Rompimiento de la dormancia en semillas y propagación *in vitro* de *Cordia elaeagnoides* A. DC.

Breaking of dormancy in seeds and *in vitro* propagation of *Cordia elaeagnoides* A. DC.

Fernando Santacruz Ruvalcaba¹, José Juvencio Castañeda Nava¹, Ana María Gaspar Peralta¹, Nancy Núñez Sandoval¹ y Antonio Mora Santacruz¹

Resumen

Cordia elaeagnoides es una especie maderable de selvas bajas caducifolias, que por la dificultad de sus semillas para germinar, la especie tiene limitaciones para reproducirse. En este contexto, se desarrolló un método para romper la dormancia y propagarla asexualmente por medio de proliferación de yemas axilares *in vitro*. Se evaluó la presencia de embriones sanos en 1 100 semillas de 11 lotes (100 semillas por lote); se constató que 39.45 % del total corresponden a esta condición. Se probaron 260 ppm de ácido giberélico con inmersión durante 24, 48 y 72 h; la primera alcanzó 96 % de germinación. Para establecer la propagación *in vitro*, se hizo rescate de embriones en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) adicionado con 2 mgL⁻¹ de benciladenina; se logró 82 % de germinación. Las plántulas obtenidas se utilizaron para la proliferación de yemas axilares, sobre las cuales se evaluaron los medios MS y McCown's, y los reguladores de crecimiento 2-isopentiladenina, cinetina y benciladenina en dosis de 1, 2 y 3 mgL⁻¹; se obtuvo un promedio de 3.03 brotes por explante tanto en cinetina como benciladenina. Para la rizogénesis *in vitro* se utilizó ácido 3-indolbutírico a dosis de 2.5 y 5 mgL⁻¹, más adenina en oscuridad o fotoperiodo; los datos revelaron que cualquier dosis del ácido 3-indolbutírico induce la rizogénesis. Se concluye que para la germinación de semillas de *Cordia elaeagnoides* es conveniente aplicar ácido giberélico para eliminar la dormancia y para la propagación asexual *in vitro*, cinetina y benciladenina en las proporciones indicadas.

Palabras clave: Ácido giberélico, *Cordia elaeagnoides* A. DC., germinación, proliferación de yemas axilares, rescate de embriones, rizogénesis.

Abstract

Cordia elaeagnoides A. DC. is a timber species of tropical deciduous forests, which from the difficulty of their seeds to germinate, the species has limitations to reproduce. In this context, a method was developed to break dormancy and asexually propagate it through axillary bud proliferation *in vitro*. The presence of healthy embryos in 1 100 lots of 11 seeds (100 seeds per lot) were evaluated; it was found that 39.45 % of them correspond to this condition. 260 ppm gibberellic acid were tested with 24, 48 and 72 immersion hours; the first one reached 96 % of germination. To establish *in vitro* propagation, embryo rescue was made in the Murashige and Skoog (MS) culture medium supplemented with 2 mg L⁻¹ benzyladenine; 82 % germination was achieved. Seedlings were used for axillary bud proliferation, on which the MS and McCown's media growth regulators 2-isopentiladenine, kinetin and benzyladenine at doses of 1, 2 and 3 mgL⁻¹ were evaluated; an average of 3.03 shoots per explant was obtained in both kinetin and benzyladenine. For *in vitro* rooting 3-indole butyric acid at doses of 2.5 and 5 mg L⁻¹ were used, plus adenine in darkness or photoperiod; data revealed that any 3-indole butyric acid dose induces rooting. It is concluded that for the germination of *Cordia elaeagnoides* seeds gibberellic acid should be applied to remove dormancy and for its asexual propagation *in vitro*, kinetin and benzyladenine in the proportions previously indicated must be used.

Key words: Gibberellic acid, *Cordia elaeagnoides* A. DC., germination, axillary bud proliferation, embryo rescue, rhizogenesis

Introducción

Las selvas bajas caducifolias reúnen una riqueza de especies considerable; habitan en ellas, por ejemplo, *Cordia alliodora* (Ruiz *et Pav.*) Oken, *Cordia elaeagnoides* A. DC., *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. y *Tabebuia palmeri* Rose.

C. elaeagnoides es integrante de la familia Boraginaceae, misma que se caracteriza, entre otros rasgos, por presentar incompatibilidad gamética (Gibbs, 1986; Brys *et al.*, 2008; Loha *et al.*, 2009; Mc Mullen, 2012). A esta especie se le denomina de distintas maneras en función de las regiones en las que crece: "cueramo" en Michoacán, "bojote" en Guerrero, "barcino" en Jalisco y "anacahuite" en Oaxaca. Su distribución en México abarca desde Jalisco hasta Chiapas y tiene gran importancia en su ecosistema pues se le considera gregaria del dosel (Van Groenendael *et al.*, 1996); por otro lado, es muy utilizada en la industria de la madera, ya que con ella se elabora una gran diversidad de productos tales como llaveros, joyas, máscaras, cajas, muebles, instrumentos musicales, juegos de salón y artículos de cocina (Pérez, 1993). *C. elaeagnoides* tiene problemas relacionados con el aborto de embriones, lo cual disminuye la germinación en condiciones naturales, a lo cual habría de agregarse que sus semillas también pueden ser atacadas por roedores generalistas (Van Groenendael *et al.*, 1996).

Las semillas constituyen la unidad móvil y de reproducción sexual de las plantas, y cumplen con la función de multiplicar y perpetuar la especie (Doria, 2010) y permiten que esta llegue a nuevos sitios y microambientes (Taiz y Zeiger, 1998).

Con el fin de que un cultivo sea exitoso es imprescindible considerar tanto la calidad de la semilla (Baskin y Baskin, 2014), como algunos factores ambientales (disponibilidad de agua, temperatura, luz, oxígeno y dióxido de carbono), ya que influyen en el porcentaje y la velocidad de germinación, muchos de los cuales son más o menos específicos para distintos taxa (Rodríguez, 2008).

La viabilidad de la semilla está determinada por características genéticas de la planta progenitora, las condiciones climáticas en distintas etapas (durante la floración, el desarrollo y la maduración del fruto), el grado de madurez de la semilla en la cosecha y el manejo en su colecta (Gallo *et al.*, 2012; Baskin y Baskin, 2014).

Se ha observado que especies de plantas originarias de ambientes en donde se presentan con frecuencia heladas y/o sequías son más propensas a cierto tipo de latencia en comparación con especies de ambientes benignos (Jurado y Flores, 2005).

Otro factor que influye considerablemente en la conservación de la viabilidad de la semilla, es la calidad y cantidad de sustancias químicas contenidas en el embrión (Doria, 2010).

Introduction

Low deciduous tropical forests gather a considerable richness of species; in them live *Cordia alliodora* (Ruiz *et Pav.*) Oken, *Cordia elaeagnoides* A. DC., *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. and *Tabebuia palmeri* Rose, for example.

C. elaeagnoides is a member of the Boraginaceae family, which has, among other traits, gametic incompatibility (Gibbs, 1986; Brys *et al.*, 2008; Loha *et al.*, 2009; Mc Mullen, 2012). This species has been named in different ways according to the regions in which it grows: "cueramo" in Michoacán, "bojote" in Guerrero, "barcino" in Jalisco and "anacahuite" in Oaxaca. Its distribution in Mexico includes from Jalisco to Chiapas and it is very important in its ecosystem as it is considered of canopy gregarious habits (Van Groenendael *et al.*, 1996); also, it is intensely used in the wooden industry as with it are made a great number of products such as key holders, jewelry, masks, boxes, furniture, music instruments, room games and kitchen gadgets (Pérez, 1993). *C. elaeagnoides* has some problems related to embryo abortions, which reduces its germination under natural conditions, to which can be added that its seeds are regularly attacked by generalist rodents (Van Groenendael *et al.*, 1996).

Seeds are the movement unit and of sexual reproduction in plants, and they accomplish the purpose of multiplying and perpetuating the species (Doria, 2010) and allow it to reach new places and microenvironments (Taiz and Zeiger, 1998).

In order to have a successful crop, it is mandatory to take into account seed quality (Baskin and Baskin, 2014), as well as some environmental factors (water availability, temperature, light, oxygen and carbon dioxide), since they have an influence on the percentage and speed of germination, much of which are more or less specific for different taxa (Rodríguez, 2008).

Seed viability is determined by the genetic characteristics of the paternal plant, the climate conditions in different stages (during flowering, the development and ripening of fruit), the degree of maturity of the seed at harvesting and the management of its collection (Gallo *et al.*, 2012; Baskin and Baskin, 2014).

It has been observed that plants that originally come from environments where frosts and droughts regularly occur are more prone to some kind of dormancy compared to species from kinder environments (Jurado and Flores, 2005).

Another factor that affects considerably the conservation of seed viability is the amount and quality of chemical substances contained by the embryo (Doria, 2010). Gibberelic acid (AG₃) activates the growth of the embryo during germination and promotes the production or secretion of hydrolytic enzymes mainly α -amylase which is involved in the solubilization of the

El ácido giberélico (AG_3) activa el crecimiento vegetativo del embrión durante la germinación y promueve la producción o secreción de enzimas hidrolíticas principalmente α -amilasa, enzima involucrada en la solubilización de las reservas del endospermo (Salinas *et al.*, 2002). El almidón y las proteínas son desdobladas por varias enzimas; los azúcares, aminoácidos y otros productos son transportados para el crecimiento del embrión (Taíz y Zeiger, 1998).

El cultivo *in vitro* permite propagar vegetales de manera asexual, y por lo tanto, multiplicar masivamente a las especies. Los reguladores de crecimiento más utilizados en la formación de brotes son benciladenina, cinetina y bencilaminopurina (del grupo de las citocininas) y la inducción puede provenir de callo, nudos o meristemos apicales (Phulwaria y Shekhawat, 2013). Se han documentado casos de rizogénesis dentro de la familia Boraginaceae al aplicar ácido indol-3-acético, ácido indol-3-butírico y ácido naftalenacético, reguladores que varían en cuanto a la eficiencia en función del taxón (Edson *et al.*, 1996; Martin, 2003; Schuler *et al.*, 2005; Phulwaria y Shekhawat, 2013).

Debido a que *Cordia elaeagnoides* en la región Costa del estado de Jalisco produce muchas semillas con aborto de embriones y presenta dificultad en la germinación de semillas, se planteó como objetivo del presente trabajo, desarrollar una técnica para romper la dormancia y propagar asexualmente la especie por medio de proliferación de yemas axilares *in vitro*.

Materiales y Métodos

Recolección de semillas

Las semillas de *C. elaeagnoides* se colectaron en Tomatlán, Jalisco, México (19°56'3" N y 105°14'8"O), a 50 msnm. Se eligieron veinte ejemplares sanos, de buena altura, fuste limpio y amplia masa foliar, con flores que mantuvieran color café (indicio que los frutos están en el mejor momento); se almacenaron en costales y cada muestra se numeró en función del árbol del que fue tomada (figuras 1a, c). Se trasladó la semilla al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Producción Agrícola del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) para su limpieza, pruebas de germinación y cultivo *in vitro*.

Identificación de embriones sanos

Para seleccionar semillas con embriones sanos se compararon dos métodos: 1) la prueba de corte en 11 lotes con un total 100 semillas evaluadas por lote. Se partió la testa de la semilla con una tijera; se observó el color y la textura del endospermo y se verificó que el embrión estuviera bien desarrollado. Se contabilizó el número de semillas con embriones sanos por lote. 2) la técnica de columna densimétrica, para determinar por medio

reserves of the endosperm (Salinas *et al.*, 2002). Starch and proteins are unfolded by several enzymes; sugars, aminoacids and other products are transported for the growth of the embryo (Taíz and Zeiger, 1998).

In vitro cultivation lets the propagation of plants in an asexual way, and therefore, to massively multiply species. The most frequently used growth regulators for sprout formation are benzyladenine, kinetin and benzylaminopurine (of the kitocinine group) and induction might come from the callus, knots and apical meristems (Phulwaria and Shekhawat, 2013). Some rhizogenesis cases have been documented within the Boraginaceae family when indol-3-acetic acid, indol-3-butyric acid and naftalenacetic acid, regulators that vary on efficiency in terms of the taxon (Edson *et al.*, 1996; Martin, 2003; Schuler *et al.*, 2005; Phulwaria and Shekhawat, 2013).

Since *Cordia elaeagnoides* in the Costa region at Jalisco state produces many seeds which aborts embryos and have difficulties in seed germination, the aim of this study was to develop a technique to break dormancy and to propagate asexually the species by means of *in vitro* axillary bud proliferation.

Materials and Methods

Seed collection

C. elaeagnoides seeds were collected in Tomatlán, Jalisco state, Mexico (19°56'3" N and 105°14'8"W), at 50 m asl. 20 healthy samples were chosen, with good height, clear stem and a wide foliar mass, with flowers that kept the brown color (which suggests that the fruits are at their best); they were kept in bags and each sample was numbered according to the tree from which they were taken (Figure 1a and Figure c). Seeds were taken to the Vegetal Tissue Cultivation Laboratory of the Agriculture Production Department of the Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA for its acronym in Spanish) for their cleaning, germination tests and *in vitro* cultivation.

Identification of healthy embryos

To select seeds with healthy embryos two methods were compared: 1) the cutting test on 11 lots with a total of 100 seeds assessed by lot. The seed cover was cut with scissors; the endosperm texture and color were observed and the good development of the embryo was checked. The number of seeds with healthy embryos by each lot was counted. 2) The densitometry column technique to determine if seeds were in good state or if they were non-viable by weight; to accomplish this, a machine was used which includes a transparent metachrylate cylinder lower with a pneumatic seed divider, which by air injection, puts apart the seeds of low weight

del peso, si las semillas estaban en buenas condiciones o eran semillas inviables para aplicarla se utilizó una máquina que consta de un cilindro de metacrilato transparente con un separador neumático de semillas, que por medio de inyección de aire, separa las semillas de menor peso (inviables) hacia un recipiente al que suben; y las que tienen un mayor peso quedan en la parte inferior de este cilindro. Se contabilizó el porcentaje de semillas sanas y las inviables, para establecer un comparativo entre estos dos métodos.

Tratamientos de semillas con ácido giberélico

Se preparó una dilución de ácido giberélico (AG_3) a 260 ppm en la que se colocaron 30 semillas de cada uno de 20 lotes, con tiempos de inmersión de 24, 48 y 72 h; se contabilizó el número de semillas germinadas de acuerdo al tiempo de inmersión en dichos tratamientos, comparando con un testigo sin tratamiento. Las semillas fueron sembradas en charolas germinadoras, como sustrato se utilizó una mezcla de musgo canadiense y vermicomposta en una proporción de 40:60 respectivamente. Todas las charolas fueron trasladadas a un invernadero a una temperatura media de 30 °C, en donde se regaron diariamente. Las evaluaciones de la germinación se realizaron a los 7, 14, 21 y 28 días.

Proliferación de yemas axilares *in vitro*

Para el establecimiento *in vitro* de *Cordia eleagnoides* fue necesario el rescate de embriones cigóticos. Las semillas se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % por un periodo de 10 min. Se enjuagaron con agua estéril y se dejaron en remojo por 24 h. Para la extracción del embrión se utilizó un microscopio estereoscópico Carl Zeiss Stemi DR 1040; se eliminó la testa y los embriones se colocaron en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 2 mgL⁻¹ de benciladenina (BA), 8 gL⁻¹ de agar.

Cuando se obtuvieron los brotes, se desarrolló un experimento con un arreglo trifactorial (3x3x2); las variables fueron los reguladores de crecimiento 2-isopentiladenina (2ip), benciladenina (BA) y cinetina (KIN), cada uno con tres concentraciones (1, 2 y 3 mgL⁻¹) y en dos diferentes medios basales, MS y McCown (Lloyd y McCown, 1980).

La elaboración de los medios de cultivo se realizó de la siguiente manera: los medios basales de los medios referidos fueron suplementados con vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979), 3 % de sacarosa y, para solidificar el medio, se aplicaron 8 gL⁻¹ de Phytigel® (Sigma Chemical Co. Cat. A-1296). Se emplearon frascos de vidrio de alimento infantil de 100 mL de capacidad como contenedores, a los cuales se les adicionaron 25 mL del medio de cultivo respectivo. Se hicieron cinco repeticiones por tratamiento (un frasco con un brote se consideró como una repetición). La evaluación del número de brotes generados se

(non-viable) towards a deposit to which such seeds get; those with a greater weight stay at the bottom of the cylinder. The per cent of healthy seeds and the non-viable ones was determined to make a comparison between the two methods.

Seed treatments with gibberellic acid

A gibberellic acid (AG_3) dilution at 260 ppm were prepared, in which 30 seeds from each of the 20 lots were placed, with immersion periods of 24, 48 and 72 h; the number of germinated seeds were counted according to the immersion time in each treatment, and they were contrasted with a control without treatment. Seeds were sown in germination trays; as a substrate was used a mix of Canadian musk and vermicompost in a 40:60 rate, respectively. All the trays were taken to a greenhouse with 30 °C as mean temperature, where they were watered every day. The assessment of germination was made at 7, 14, 21 and 28 days.

Proliferation of *in vitro* axillary buds

In order to establish *Cordia eleagnoides in vitro* it was necessary to rescue cygotic embryos. Seeds were disinfected in a 3 % sodium hypochlorite solution for 10 minutes. They were rinsed with sterile water and were left soaking for 24 h. A Carl Zeiss Stemi DR 1040 stereomicroscope was used for embryo extraction; the testa was removed and the embryos were placed in the MS cultivation medium (Murashige and Skoog, 1962) to which 2 mgL⁻¹ benzyladenine (BA) and 8 gL⁻¹ agar were added.

Once the sprouts were obtained, an experiment with a three-factor arrangement (3x3x2) was established; the variables were the 2-isopentiladenine (2ip), benzyladenine (BA) and kinetin (KIN), growth regulators each one with three concentrations (1, 2 and 3 mgL⁻¹) and in two basic media, MS and McCown (Lloyd and McCown, 1980).

Cultivation media were made as follows: the basal media of the referred media were supplemented with L2 vitamins (Phillips and Collins, 1979), 3 % saccharose and, for the solidification of the medium, 8 gL⁻¹ of Phytigel® (Sigma Chemical Co. Cat. A-1296) were used. 100 mL child food bottles were used as containers, to which 25 mL cultivation medium was added. Five replications by treatment were made (a bottle with a spout was taken as a replication). The assessment of the number of sprouts was made after 45 days from the beginning of the experiment. Both substrates were fitted to a 5.8 pH before the sterilization of the autoclave (121 °C a 1.2 kg cm⁻² of pressure during 15 min). The incubation of the vegetal material in the experiments was at 27 ± 2 °C with a 16 h photoperiod of fluorescent light at 1 500 lux (25 μmol s⁻¹ m⁻²).

llevó acabo a los 45 días de iniciado el experimento. Ambos sustratos se ajustaron a un pH 5.8, previo a la esterilización en autoclave (121 °C a 1.2 kg cm⁻² de presión durante 15 min). La incubación del material vegetal en los experimentos fue a 27 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 h de luz fluorescente a 1 500 lux (25 µmol s⁻¹ m⁻²).

Inducción de rizogénesis y elongación de tallos

Para la inducción de raíces se estableció un ensayo con un diseño en arreglo trifactorial 3x2x2, en el cual se utilizó el ácido indol3butírico en tres diferentes concentraciones (0, 2.5 y 5 mgL⁻¹), la presencia o ausencia de adenina (40 mgL⁻¹), fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) y oscuridad durante las 24 h. Los tratamientos que requerían de oscuridad se cubrieron completamente con papel aluminio. El medio utilizado fue McCown y como gelificante 3 gL⁻¹ de Phytigel®. La incubación del material vegetal en los experimentos se realizó a una temperatura de 27 ± 2 °C. Cada tratamiento contó con cinco repeticiones y fueron evaluados a los 45 días.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la propagación asexual mediante el cultivo *in vitro* de *Cordia elaeagnoides* se utilizó el software Statgraphics Plus 4.0®. Se realizaron los análisis de varianza para cada uno de los experimentos mediante los cuales se evaluaron las variables de respuesta correspondientes, además de realizar la comparación múltiple de medias mediante la prueba de diferencias mínimas significativas (LSD).

Resultados y Discusión

Identificación de embriones sanos

El porcentaje de embriones sanos fue bajo; en la prueba que se realizó por corte en la semilla, fueron 39.45 % en promedio y 60.55 % estaban dañados (Figura 1b); con la separación por columna densimétrica se obtuvieron 33.45 % sanos y 66.55 % dañados; no hubo grandes diferencias entre las dos técnicas, sin embargo por el método manual se contabilizó un mayor número de embriones sanos (Cuadro 1), lo que puede atribuirse a un error de observación, ya que es difícil determinar si están enteros y completamente desarrollados. La técnica de la columna densimétrica se perfila como una prueba rápida y confiable. Los conteos son importantes, ya que permiten observar tendencias en la sanidad de semillas.



Rhizogenesis induction and stem elongation

For root induction an assay was established with a three-factor 3x2x2 arrangement design, in which the indol3butíric acid in three concentrations (0, 2.5 and 5 mgL⁻¹) was used, as well as adenine presence or absence (40 mgL⁻¹), photoperiod (16 h light/8 h darkness) and 24 h darkness. The treatments that demanded darkness were completely covered with an aluminium sheet. McCown medium was used and gL⁻¹ of 3 Phytigel™ as a jellifying agent. The incubation of vegetal matter in the experiments was carried out at 27 ± 2 °C. Each treatment had five replications and they were assessed after 45 days.

Statistical analysis

The Statgraphics Plus 4.0™ software was used for the statistical analysis of the asexual propagation by *in vitro* cultivation of *Cordia elaeagnoides*. Analysis of variance was made for each of the experiments by means of which the response variables were assessed, in addition to perform the media multiple comparison by the least significant difference test (LSD).

Results and Discussion

Identification of healthy embryos

The healthy embryos per cent was low; in the seed cutting test, it was 39.45 % average and 60.55 % were damaged (Figure 1b); with the densitometry column, there were 33.45 % healthy ones and 66.55 % damaged; there were not great differences between the two techniques, but the manual method revealed a greater number of healthy embryos (Table 1), which can be attributed to an observation error, since it is difficult to determine if they are full and completely formed. The second technique is revealing as a fast and reliable test. Counts are important, since they allow the observation of tendencies in the sanity of seeds.

Determination of AG₃ treatments for seed germination

There were different responses to germination in the treatment that included three imbibition periods and 260 ppm of AG₃. The seeds from lots number 13, 17 and 19 had the best results (Table 2); *C. elaeagnoides* germination was favored by the breaking of dormancy as a consequence of AG₃; when the three periods were compared, the optimum was that of lot 13 (24 h imbibition in 260 ppm AG₃), since 96.6 % of its seeds germinated. The activation of the embryo generally is due to the enzymatic stimulation pondered by AG₃; Salinas *et al.* (2002) indicate that



Cuadro 1. Comparación de dos métodos para determinar el porcentaje de semillas de *Cordia elaeagnoides* A. DC. con embriones sanos en 11 lotes.

Lote	Porcentaje de embriones sanos por método de corte de semilla [†]	Porcentaje de embriones sanos por método de columna densimétrica [†]
1	20	22
4	35	40
5	41	30
7	50	32
8	49	35
9	61	49
10	22	30
13	31	40
17	42	40
19	45	35
20	38	15
Promedio	39.45	33.45
Desviación estándar	12.17	9.34
Coeficiente de variación	30.86	27.92

[†] n = 100 semillas por metodología en cada lote

Determinación de tratamientos de semillas con AG₃ para la germinación

En el tratamiento que consideró 3 tiempos de imbibición y una dosis de 260 ppm de AG₃ hubo respuestas de germinación variables; las semillas de los lotes 13, 17 y 19 tuvieron los mejores resultados (Cuadro 2); la germinación *C. elaeagnoides* fue beneficiada por la ruptura de la dormancia, como efecto del AG₃; al comparar los tres tiempos, el óptimo fue el correspondiente al lote 13 (24 h de imbibición en 260 ppm de AG₃), ya que de él germinó 96.6 % de las semillas. La activación del embrión generalmente se debe a la estimulación enzimática mediada por el AG₃; Salinas *et al.* (2002) indican que este ácido promueve la síntesis de algunas enzimas, entre las cuales destacan la α -amilasa y la dextrina límite, la α y β glucosidasas, las endo- β gluconasas y las endoxilasas, lo que permite la movilización de hidratos de carbono para el crecimiento y desarrollo del embrión.

this acid promotes the synthesis of some enzymes, among which the α -amilase and extreme dextrine, the α and β glucosidasas, the endo- β gluconases and the endoxilases are outstanding, which allows the movement of carbon hydrates for the growth and development of the embryo.

During the germination tests of *Cordia elaeagnoides* seeds it was found that in most of the studied lots that did not have AG₃, there was no response. The lots number 17, 19 and 13 (Table 2) with the 24 h imbibition treatment and 260 ppm AG₃ reached the highest germination per cents and number 13 was particularly good. It is acknowledged that there are some limitations to obtain complete seeds and their germination in Boraginaceae species, which seems to be a reaction to several morphologic or physiologic disorders, a problem that is related to distily, which is an incompatibility response according to Brys *et al.* (2008) and Mc Mullen (2012) which affects species of the *Cordia* genus.



Table 1. Comparison of two methods to determine the percentage of *Cordia elaeagnoides* A. DC. seeds with healthy embryos in 11 lots.

Lot	Healthy embryo per cent by the cutting seed method ¶	Healthy embryo per cent by the densimetric column method ¶
1	20	22
4	35	40
5	41	30
7	50	32
8	49	35
9	61	49
10	22	30
13	31	40
17	42	40
19	45	35
20	38	15
Average	39.45	33.45
Standard deviation	12.17	9.34
Variation coefficient	30.86	27.92

¶ n = 100 seeds by method in each lot.

Durante las pruebas de germinación de las semillas de *Cordia elaeagnoides* se observó en la mayor parte de los lotes estudiados que no tuvieron AG₃ no se estimuló dicha respuesta. Los lotes de semillas 17, 19 y 13 (Cuadro 2) con tratamiento de imbibición de 24 h y 260 ppm de AG₃ fueron los que alcanzaron más altos porcentajes de germinación y de ellos sobresalió el 13. Se reconocen limitaciones en la obtención de semillas completas y la germinación de ellas en especies de la familia Boraginaceae, lo que parece responder a diversos desórdenes morfológicos o fisiológicos, problema que está relacionado con la distilia, que es una reacción de incompatibilidad que según Brys *et al.* (2008) y Mc Mullen (2012) afecta a muchas especies del género *Cordia*.



Axillary bud proliferation in spouts of *Cordia elaeagnoides*

The *in vitro* propagation of the species started with the establishment of the cygotic embryo rescue from the seed; the obtained results with this technique were good, as the total germination per cent was 82. After two day from the establishment the germination process started with the cotyledon display (Figure 1d); after 7 days of having started the cultivation, the development of the plant was optimal, and it even showed root signs. After 30 days oxidation problems appeared in most of the developed plants. The embryo rescue technique has been successfully used in *Persea americana* Mill in a program for the vegetative multiplication in order to make genetic improvement. The mature and immature embryos were extracted and cultivated in a MS medium half of its concentration and 0.5 mgL⁻¹ 6-benzyl amino purine and the same amount of gibberelic acid was added (Rodríguez *et al.*, 1999). *Pinus maximartinezii* Rzedowski has also been used for its propagation in this same way, in order to preserve and expand this species in danger of extinction (Ojeda *et al.*, 2006).



Cuadro 2. Rompimiento de la dormancia en semillas de *Cordia elaeagnoides* A. DC. mediante tratamientos de inmersión en ácido giberélico (AG₃).Table 2. Breaking of dormancy of *Cordia elaeagnoides* A. DC. seeds by treatments of immersion in gibberellic acid (AG₃).

Número de lote	Número de semillas germinadas por tratamiento						
	Sin imbibición	Imbibición en agua (24 h)	Imbibición (24 h/ perforadas)	Sin AG ₃	AG ₃ (24 h)	AG ₃ (48 h)	AG ₃ (72 h)
1	0	0	1	1	10	0	0
2	0	0	0	0	8	0	0
3	0	0	3	2	1	1	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	2	1	0	0
7	0	0	0	0	4	0	0
8	0	0	1	3	5	0	0
9	0	0	0	1	8	0	0
10	0	0	0	0	1	0	0
11	0	0	0	0	1	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	6	0	29	1	0
14	0	1	1	1	0	0	0
15	0	2	3	2	11	0	0
16	0	0	0	2	4	0	0
17	0	0	3	1	13	1	0
18	0	0	0	2	8	0	0
19	0	0	3	1	12	1	0
20	0	0	1	2	2	0	0
Desviación estándar		0.48	1.65	0.97	7.01	0.41	

* n = 30 semillas por tratamiento en cada lote

* n = 30 seeds per treatment in each lot

Proliferación de yemas axilares en brotes de *Cordia elaeagnoides*

La propagación *in vitro* de la especie se inició con el establecimiento a partir del rescate de embriones cigóticos de la semilla; los resultados obtenidos con esta técnica fueron satisfactorios, pues del total de los embriones rescatados se obtuvo 82 % de germinación. A los 2 días posteriores al establecimiento, se inició el proceso de germinación con el despliegue de los cotiledones (Figura 1d). Después de siete días de iniciado el cultivo, el desarrollo de la planta era óptimo, incluso presentaron indicios

Axillary bud proliferation in spouts of *Cordia elaeagnoides*

The *in vitro* propagation of the species started with the establishment of the cygotic embryo rescue from the seed; the obtained results with this technique were good, as the total germination per cent was 82. After two day from the establishment the germination process started with the cotyledon display (Figure 1d); after 7 days of having started the cultivation, the development of the plant was optimal, and it even showed root signs. After 30 days oxidation problems appeared in most of the developed plants. The embryo rescue technique has been

radiculares. A los 30 días los problemas oxidativos comenzaron a presentarse en la mayoría de las plantas desarrolladas. La técnica de rescate de embriones ha sido utilizada anteriormente exitosamente en *Persea americana* Mill, en un programa para la multiplicación vegetativa con el fin de llevar a cabo mejoramiento genético. Los embriones maduros e inmaduros fueron extraídos y cultivados en medio MS a la mitad de su concentración y se les adicionó 0.5 mgL^{-1} de 6-bencil amino purina y la misma cantidad de ácido giberélico (Rodríguez *et al.*, 1999). *Pinus maximartinezii* Rzedowski también ha sido propagada de esta forma, con el propósito de conservar y expandir a esta especie en peligro de extinción (Ojeda *et al.*, 2006).

Una vez que se corroboró la viabilidad de las semillas y la sanidad de los embriones, se eliminaron los compuestos fenólicos (su abundante producción se observó en la germinación en papel absorbente), lo que se logra mecánicamente, al raspar la testa; este procedimiento ayuda a evitar la oxidación del medio de cultivo y a eliminar la dureza de la cubierta seminal. Se pudo advertir que, a pesar de que la testa se raspaba casi en su totalidad, no hubo respuesta germinativa; esto puede indicar que la latencia física y la presencia de compuestos fenólicos no son el único obstáculo que enfrentan las semillas de *C. elaeagnoides*. Habría de suponerse que existen otros inhibidores de la germinación, como pudiera ser el ácido abscísico (ABA), que protege a la planta en escenarios de estrés al inhibir la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos e inducir la abscisión y la senescencia; además afecta las membranas y mantiene el nivel de otras hormonas y controla el almacenamiento de proteínas de reserva (Zhang *et al.*, 2012); se recomienda realizar un análisis de concentración de ABA en las semillas de *C. elaeagnoides* para determinar su participación en este proceso.

Después de 45 días no hubo significancia en la producción de brotes por el tipo de medio ($p=0.1714$), ni por la cantidad de regulador ($p=0.0714$); en el caso del regulador utilizado hubo alta significancia ($p=0.0004$), al realizar una comparación múltiple de medias con ayuda de la prueba de Diferencias Mínimas Significativas (LSD). La mayor estimulación de brotes pasado este lapso la ejercieron los tratamientos en presencia del regulador de crecimiento KIN y BA, con una eficiencia superior de hasta 1.5 veces más que 2ip (Cuadro 3) (Figura 1f). Con respecto a la concentración, aunque en la prueba de análisis de varianza no se muestra una diferencia, se confirma cierta tendencia positiva al generar un número de brotes más alto y una menor oxidación de los tejidos cuando son utilizadas concentraciones más bajas (1 mgL^{-1}). Esto ha sido mencionado por Balla *et al.* (2002) quienes explican que la adición de citocininas tiene un efecto represor de la dominancia apical, lo que provoca la proliferación de brotes por medio de la estimulación de las yemas axilares. Los tejidos oxidados fueron muy notorios conforme el transcurso del tiempo, en particular aquellas estructuras con el regulador 2ip y en la mayor concentración 3 mgL^{-1} , además de generar callo pubescente en la parte basal (Figura 1g).

successfully used in *Persea americana* Mill in a program for the vegetative multiplication in order to make genetic improvement. The mature and immature embryos were extracted and cultivated in a MS medium half of its concentration and 0.5 mgL^{-1} 6-benzyl amino purine and the same amount of gibberelic acid was added (Rodríguez *et al.*, 1999). *Pinus maximartinezii* Rzedowski has also been used for its propagation in this same way, in order to preserve and expand this species in danger of extinction (Ojeda *et al.*, 2006).

Once the viability of seeds and the health of the embryos was confirmed, the phenolic compounds were removed (its abundant production was observed in the germination on filter paper), which is accomplished mechanically by shaving the testa; this procedure helps to avoid the oxidation of the cultivation medium and to soften the seed cover. It was detected that, in spite of shaving almost all of the testa, there was no germination response; this might suggest that physical dormancy and the presence of phenolic compounds are not the only handicap that *C. elaeagnoides* seeds face. It may be understood that there must be other germination inhibitors such as the abscisic acid (ABA) that protects the plants in a stress scenario by blocking protein and nucleic acids synthesis and induce abscission and senescence; it also affects membranes and keeps the level of the rest of the hormones and controls the storage of reserve proteins (Zhang *et al.*, 2012); it is advised to run an ABA concentration analysis in the seeds of *C. elaeagnoides* in order to determine its role in this process.

After 45 days there were no significance in the sprout production by type of medium ($p=0.1714$), nor by the amount of the regulator ($p=0.0714$); in the second case, when making the multiple mean comparison with the help of the Least Significant Differences (LSD) there was a very high significance ($p=0.0004$). The greatest sprout stimulation in this periods was exerted by the treatments which had KIN and BA growth regulators, with a greater efficiency up to 1.5 times more than 2ip (Table 3) (Figure 1f). In regard to concentration, even if the analysis of variance test does not show any difference, a somehow positive tendency is confirmed when a greater number of sprouts and a smaller tissue oxidation are generated, when there are used lower concentrations (1 mgL^{-1}). This has been stated by Balla *et al.* (2002) who explain that the addition of kitocinines has a repressive effect over apical dominance, which provokes sprout proliferation by means of the axillary bud stimulation. The oxidized tissues became more apparent as time went by, in particular in those structures with 2ip regulator and in the highest concentration, 3 mgL^{-1} , besides producing pubescent callus in the basal part (Figure 1g).

It was strictly necessary to add growth regulators to induce sprouts of *C. elaeagnoides*, which differs from that registered by Tacoronte *et al.* (2004), who propagated another tropical woody species, *Swietenia macrophylla* King, by means of

Fue estrictamente necesario adicionar reguladores de crecimiento para inducir los brotes en *C. elaeagnoides*, lo que difiere con lo consignado por Tacoronte *et al.* (2004), quienes propagaron otra especie maderable tropical, *Swietenia macrophylla* King, por medio de yemas axilares y con la mejor respuesta en ausencia de reguladores de crecimiento. En *Arnebia hispidissima* (Lehm.) A. DC., especie que pertenece también a la familia Boraginaceae, el uso de los reguladores KIN y BAP es favorable para la producción de brotes (Phulwaria y Shekhawat, 2013).

Aunque estadísticamente no se confirmó significancia con respecto a los medios basales, los cultivos en el medio MS comenzaron a generar un mayor número de brotes en un principio, pero en los análisis posteriores, estos brotes se redujeron por el aumento en la oxidación, y mostraron un ligero amarillamiento. En el medio McCown, por el contrario, los cultivos manifestaron un número inferior de brotes, pero la oxidación fue menor y presentan una coloración muy favorable. Cualitativamente se mostró una estrecha relación entre el tipo de medio de cultivo utilizado y el regulador adicionado, de lo que resultó ser más eficiente la utilización de BA para el medio MS y KIN para el medio McCown.

La oxidación puede deberse principalmente por la acumulación de compuestos fenólicos y principalmente al etileno. También a cierta sensibilidad a los reguladores de crecimiento, pues fue más notoria en aquellos que presentaban una mayor concentración de dichos compuestos (Basail *et al.*, 2006).

Schuler *et al.* (2005) demostraron que *Cordia alliodora* presenta una tasa de pérdida muy alta en el cultivo de tejidos vegetativos y la catalogaron como una especie recalcitrante para el cultivo *in vitro*. *C. elaeagnoides* también podría considerarse dentro de este tipo de especies por la tasa de pérdida ocasionada por la oxidación y acumulación de etileno, lo cual fue difícil controlar y causó detrimento considerable a los brotes.

Inducción de rizogénesis y elongación de tallos

Después de transcurridos 45 días del establecimiento, dos factores tuvieron alta significancia para estimulación de raíces: la concentración del regulador ($p=0.0001$) y la presencia o ausencia de luz para inducción del número de las mismas ($p=0.0000$). La utilización de 1500 lux con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad fue el mejor tratamiento para generar raíces (1.43 raíces por explante a los 45 días).

Al realizar la comparación múltiple de medias mediante la prueba LSD para la inducción de raíces, se encontró que la mayor estimulación de rizogénesis después de los 45 días (Figura 1e), la ejercían los tratamientos en presencia de ácido indol-3 butírico en concentraciones de 2.5 y 5 mgL^{-1} (Cuadro 4).

axillary buds and with the best response without growth regulators. In *Arnebia hispidissima* (Lehm.) A. DC., a species that also belongs to the Boraginaceae family, the use of KIN and BAP regulators is favorable for sprout production (Phulwaria and Shekhawat, 2013).

Even if statistical significance was not confirmed in regard to basal media, the cultivations in the MS medium started to generate a greater number of sprouts at first, but later analysis revealed that they reduced from the increase in oxidation and showed a light yellowness. In the McCown medium, on the other hand, cultivations showed a lower number of sprouts but oxidation was lower and they show a better color. Qualitatively there was a closer relation between the kind of cultivation medium that was used and the added regulator, from which came out as the most efficient the use of BA for the MS and KIN for the McCown media.

Oxidation might be due mainly to the accumulation of phenolic compounds and, mainly, to ethylene. It can also be attributed to some sensibility of growth regulators, since it was more notorious in those which had a greater concentration of such substances (Basail *et al.*, 2006).

Schuler *et al.* (2005) proved that *Cordia alliodora* has a very high loss rate in vegetative tissue cultivation, which allows to classify it as a recalcitrant species for its *in vitro* cultivation. *C. elaeagnoides* could also be considered within this category from the loss rate provoked by oxidation and ethylene accumulation, which was difficult to control and provoked a considerable damage to sprouts.

Induction of rhizogenesis and stem elongation

After 45 days from the establishment, two factors were highly significant for root stimulation: regulator concentration ($p=0.0001$) and the absence of light to induce their number ($p=0.0000$). The use of 1500 lux with a 16 light h and 8 darkness h photoperiod was the best treatment to generate roots (1.43 roots per explant after 45 days).



Las auxinas están involucradas en casi todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta, desde el estado embrionario hasta el estado reproductivo. Una de sus funciones es la elongación de los tallos por medio de la estimulación de la división celular y también la formación del sistema radicular (Phulwaria y Shekhawat, 2013). Por ello su aplicación exógena resulta ser esencial en diferentes especies para inducción de rizogénesis, como sucede con *C. elaeagnoides*, pues está estrechamente emparentada con *Cordia alliodora*; Schuler *et al.* (2005) intentaron su enraizamiento solamente con la adición de sacarosa (15 gL^{-1}) y carbón activado (2 gL^{-1}), y no lo lograron. Por el contrario, Tacoronte *et al.* (2004) obtuvieron el enraizamiento de *Swietenia macrophylla* por medio de un balance entre auxinas y citocininas (8.9 mgL^{-1} de ácido indol 3-butírico (AIB), 2.2 mgL^{-1} de ácido naftalenacético (ANA), 4.0 mgL^{-1} de KIN).

Después de transcurrido el periodo indicado se observó una tasa de pérdida de tejidos muy alta, todo debido a la excesiva producción de etileno derivada de la acción del ácido indolacético como otras auxinas sintéticas (Zhao y Hasenstein, 2009). Muchos de los efectos de las auxinas se deben a la coparticipación con el etileno al inhibir su producción; en este caso la actividad de las auxinas se afectó, por lo que se recomienda adicionar agentes antioxidantes al medio de cultivo para el enraizamiento.

La utilización de $1\,500 \text{ lux}$ fue altamente significativa ($P=0.0001$) para la elongación de los tallos, lo que aumentó 0.7 cm en promedio, mientras que en etiolación (sin iluminación) sólo aumentaron 0.3 cm . La ausencia de luz prepara a los explantes para el enraizamiento por medio de la estimulación de la producción de auxinas, por lo que la aplicación de técnicas como la etiolación permite iniciar el proceso de rizogénesis (Castro y Sánchez, 2010). La presencia de luz conserva un mayor número de brotes y, por el contrario, la etiolación genera una alta tasa de pérdida de los tejidos, en primera instancia debido a la baja tasa de fotosíntesis, por lo que los tejidos se comienzan a tornar amarillentos y posteriormente mueren. El segundo efecto negativo de la etiolación fue la estimulación de producción de etileno, por lo que la abscisión y muerte de los brotes era cada vez mayor conforme el transcurso del tiempo.

Se recomienda experimentar con diferentes periodos de etiolación, que favorezcan mejores resultados y observar la elongación de los tallos, ya que en el experimento aquí descrito no fue posible por la pérdida de la mayoría de los explantes.



Cuadro 3. Comparación múltiple de medias de Diferencias Mínimas Significativas para el número de brotes de *Cordia elaeagnoides* A. DC. a los 45 días.

Table 3. Multiple mean comparison of the Least Significant Differences (LSD) for the number of sprouts of *Cordia elaeagnoides* A. DC. after 45 days.

Regulador de crecimiento	Número de Brotes [†]
2ip	$1.53 \pm 0.27 \text{ a}$
KIN	$3.03 \pm 0.27 \text{ b}$
BA	$3.03 \pm 0.27 \text{ b}$

[†] Regulador de crecimiento = Growth regulator; Número de brotes = Number of sprouts

Medias $\pm$ error estándar con la misma letra no son significativamente diferentes $P \leq 0.05$. (n = 30)

[†] Means $\pm$ standard error with the same letter are not significantly different $p \leq 0.05$. (n = 30)

When the media multiple comparison was made by the LSD test for root induction, it was found that the greatest rhizogenesis stimulation after 45 days (Figure 1e) was exerted by the treatments with indol-3butiric acid in 2.5 and 5 mgL^{-1} concentration (Table 4). Auxins are involved in almost all the plant's growth and development aspects, from the embryo state up to the reproductive state. One of its functions is stem elongation by means of the cell division stimulation as well as the root system formation (Phulwaria and Shekhawat, 2013). Therefore, its exogenous application becomes essential in different species to induce rhizogenesis, as it happens with *C. elaeagnoides*, as it is closely related to *Cordia alliodora*; Schuler *et al.* (2005) intended their rooting only with sacarose (15 gL^{-1}) and activated carbon (2 gL^{-1}) and they did not accomplish it. On the other hand, Tacoronte *et al.* (2004) obtained the rooting of *Swietenia macrophylla* through a balance of auxins and kitocinines (8.9 mgL^{-1} indol 3-butiric acid (AIB), 2.2 mgL^{-1} naftalenacetic acid (ANA), 4.0 mgL^{-1} KIN).

After the indicated number of days went by, a very high tissue loss rate was observed, all due to an excessive ethylene production that came from the indolacetic acid as well as other synthetic auxins (Zhao and Hasenstein, 2009). Many effects of auxins are due to a co-participation with ethylene as it inhibits production; in this case, the activity of auxins was affected, from which it is advised to add antioxidant agents to the cultivation media for rooting.

The use of $1\,500 \text{ lux}$ was highly significant ($p=0.0001$) for the stem elongation, which increased 0.7 cm average, while in etiolation (without lighting) they only increased 0.3 cm . The absence of light prepares the explants for rooting by means of the stimulation of the auxins production, and thus, the application of techniques such as etiolation allows to start a rhizogenesis process (Castro and Sánchez, 2010). Light preserves a higher number of sprouts and, on the other hand, etiolation generates a high rate of loss of tissues, first due to a low photosynthesis

Por lo anteriormente expuesto en el presente trabajo se considera que *C. elaeagnoides* amerita ser estudiada más a detalle en la biología de la reproducción para tener mayor conocimiento de sus limitaciones en la germinación y viabilidad de la semilla, ya que es un árbol de interés maderable de las selvas bajas caducifolias de la vertiente del Pacífico de México.



rate, which makes them to become yellowish and they die afterwards. The second negative effect of etiolation was the stimulation of the ethylene production, thus provoking a greater abscission and death of sprouts as time went by.

It is advised to make some experiments with different etiolation periods, which favor better results and observe elongation of stems, since in the experiment here described was not possible from the loss of most explants.

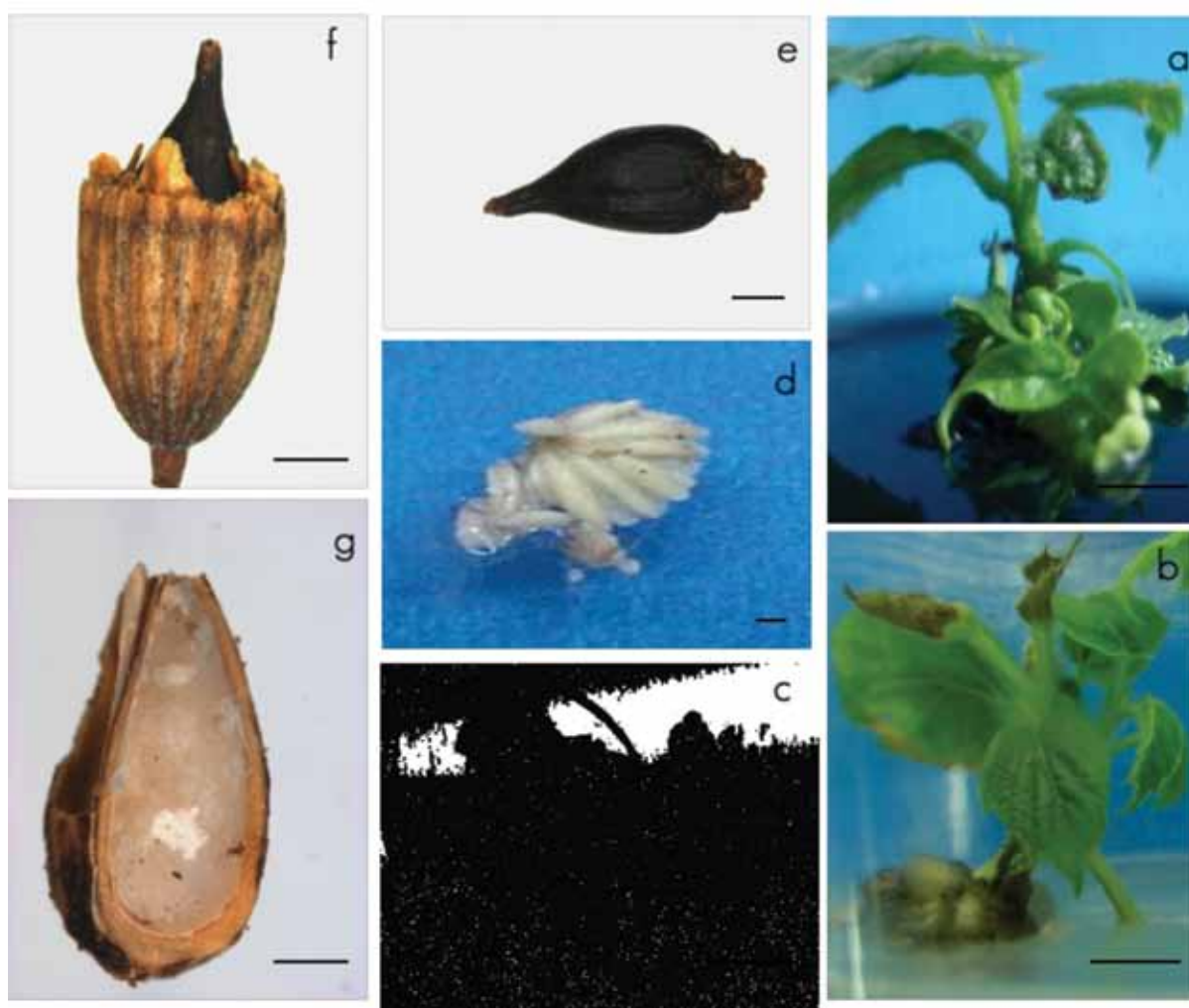


Figura 1. Semillas y propagación *in vitro* de *Cordia elaeagnoides* A. DC. a) Semilla completa con cáliz; b) Embrión sano al centro, embrión dañado a la izquierda; c) Semilla entera; d) Rescate de embrión *in vitro* (Barras a-d = 1 mm); e) Fase de enraizamiento; f) Proliferación de brotes a partir de yemas axilares 45 d; g) Brotes con signos de oxidación a los 45 días (Barras e-g = 1 cm).

Figure 1. *Cordia elaeagnoides* A. DC. seeds and *in vitro* propagation. a) Complete seed with calyx; b) Healthy embryo at the center, damaged embryo to the left; c) Whole seed; d) *In vitro* embryo rescue (Bars a-d = 1 mm); e) Rooting phase; f) Sprout proliferation from axillary buds after 45 days; g) Sprouts with oxidation signs after 45 days (Bars e-g = 1 cm).

Conclusiones

La selección de semilla en *C. elaeagnoides* con embriones sanos es importante para asegurar un porcentaje alto de germinación, misma que se favorece con períodos de inmersión de la semilla en ácido giberélico (AG_3) por 24 h, preferentemente. La propagación *in vitro* es factible en la especie, a partir del rescate de embriones cigóticos, y la proliferación de brotes a partir de yemas axilares con la adición de las citocininas, cinetina o benciladenina y la inducción de raíces con la presencia de la auxina ácido indol3butírico. 🌱



Cuadro 4. Comparación múltiple de medias de Diferencias Mínimas Significativas para el número de raíces de *Cordia elaeagnoides* A. DC. estimulados a los 45 días.

Table 4. Media multiple comparison by the Least Significant Differences test for the number of *Cordia elaeagnoides* A. DC. stimulated after 45 days.

Concentración Ácido Indol3butírico	Número de Brotes [†]
0 mgL ⁻¹	0.20±0.08 a
2.5 mgL ⁻¹	3.70±0.09 b
5 mgL ⁻¹	4.52±0.08 b

[†] Medias±error estándar con la misma letra no son significativamente diferentes $P \leq 0.05$ (n = 20)

[†] Means± standard error with the same letter are not significantly different $P \leq 0.05$ (n = 20)

For the formerly exposed in this paper, it is considered that *C. elaeagnoides* must be studied with more detail in its reproductive biology in order to have a broader knowledge about their germination and viability limitations since it is an interesting woody tree of the low deciduous tropical forest of the Mexican Pacific slope.

Conclusions

The selection of *C. elaeagnoides* seeds with healthy embryos is important to guarantee a high germination per cent, which is favored, preferably, with immersion periods in gibberelic acid (AG_3) for 24 h. *In vitro* propagation is feasible in the species, from a cygotic embryo rescue and sprout proliferation from axillary buds, with the addition of cytokinins, kinetin and benziladenine and root induction by the indol 3-butiric acid auxin. 🌱

End of the English version

Referencias

- Balla, J., J. Blažková, V. Reinov and S. Prochvía. 2002. Involvement of auxin and cytokinins in initiation of growth of isolated peabuds. *Plant Growth Regulation* 38: 149-156.
- Basail, M., R. G. Kosky, V. Medero, E. Otero, M. Torres, M. Cabrera, J. López, M. García, A. Santos, A. Rayas, J. Ventura, M. Bauta, M. Álvarez, E. Páz, Y. Beovidez, J. Albert, A. Espinosa y J. García. 2006. Influencia de reguladores e inhibidores del crecimiento en la multiplicación de brotes axilares del cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) en sistema de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal* 6: 23 - 28.
- Baskin, C. C. and J. M. Baskin. 2014. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Academic Press. San Diego, CA, USA. 1600 p.
- Brys, R., H. Jacquemyn, M. Hermy and T. Beeckman. 2008. Pollen deposition rates and the functioning of distily in the perennial *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *Plant Systematics and Evolution* 273: 1-12.
- Castro, R. D. y G. A. Sánchez R. 2010. Propagación clonal *in vitro* de *Eucalyptus pellita* F. Muell a partir de árboles plus. *Temas Agrarios* 15: 34 - 43.
- Doria, J. 2010. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales* 31 (1): 74-85.
- Edson, J. L., A. D. Lege-Brusven, R. L. Everett and D. L. Wenny. 1996. Minimizing growth regulators in shoot culture of an endangered plant, *Hackelia venusta* (Boraginaceae). *In vitro Cellular & Developmental Biology* 32: 267-271.
- Gallo, C., J. M. Enrico, R. Cravotto y M. Arango. 2012. Variabilidad de la viabilidad y vigor de lotes de semillas de soja con presencia de simientes verdes pertenecientes a cultivares de distintos grupos de maduración producidos en dos fechas de siembra. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 38: 133-140.
- Gibbs, P. E. 1986. Do homomorphic and heteromorphic self-incompatibility systems have the same sporophytic mechanism? *Plant Systematics and Evolution* 154: 285-323.
- Jurado, E. and J. Flores. 2005. Is seed dormancy under environmental control or bound to plant traits? *Journal of Vegetation Science* 16: 559-564.

- Lloyd, G. and B. H. McCown. 1980. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel (*Kalmia latifolia*) by shoot tip culture. *Proceedings International Plant Propagators Society* 30: 421-427.
- Loha, A., M. Tigabu and A. Fries. 2009. Genetic variation among and within populations of *Cordia africana* in seed size and germination responses to constant temperatures. *Euphytica* 165: 189-196.
- Martin, K. P. 2003. Rapid *in vitro* multiplication and *ex vitro* rooting of *Rotula aquatica* Lour., a rare rheophytic woody medicinal plant. *Plant Cell Reports* 21: 415-420.
- Mc Mullen, C. K. 2012. Pollination of heterostylous Gálapagos native, *Cordia lutea* (Boraginaceae). *Plant Systematics and Evolution* 298: 569-579.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Ojeda Z., M. C., H. L. Olvera, L. M. Ramos, M. J. Star, T. Cepeda, P. Alférez, L. I. Donjuan, E. O. Sáenz, R. Sáenz y E. C. Cerda. 2006. Multiplicación *in vitro* del Piñón Azul *Pinus maximartinezii* (Rzedowski). *Phyton* 75: 109-113.
- Orantes G., C., M. A. Pérez F., T. M. Rioja P. y E. R. Garrido R. 2013. Viabilidad y germinación de semillas de tres especies arbóreas nativas de la selva tropical, Chiapas, México. *Polibotánica* 36: 117-127.
- Pérez O., C. P. 1993. Anatomía de la madera de ocho especies con importancia en las artesanías del estado de Michoacán. *Acta Botánica Mexicana* 23: 103-136.
- Phillips, G. C. and G. B. Collins. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Science* 19:59-64.
- Phulwaria, M. and N. S. Shekhawat. 2013. An efficient *in vitro* shoot regeneration from immature in florescence and *ex vitro* rooting of *Arnebia hispidissima* (Lehm). DC. - A red dye (Alkannin) yielding plant. *Physiology Molecular Biology of Plants* 19(3): 435-441.
- Rodríguez E., M. R. 2008. Influencia de la temperatura en la germinación de semillas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze «taya» de cuatro localidades del Departamento La Libertad, Perú. *Arnaldoa* 15: 87 - 100.
- Rodríguez, N. N., M. Capote y V. Zamora. 1999. Cultivo *in vitro* del aguacatero (*Persea americana* Mill.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 231-237.
- Salinas, A. R., A. M. Yoldjian, M. L. Dietrich, R. M. Craviotto y V. Bisaro. 2002. Comportamiento de glicinina, β -conglucina y α -amilasa en semillas de soja deterioradas y no deterioradas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 1175-1181.
- Schuler G., I., S. Baquero O., D. Gaona T., E. Vega G., J. Rodríguez R., C. Ramírez S., V. Nieto R. y E. Hodson J. 2005. Propagación *in vitro* de material seleccionado de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. (Ocobo) y *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken (Nogal Cafetero). *Revista Colombiana de Biotecnología* 6: 39-50.
- Tacoronte, M., M. Vielma, A. Mora y C. Valecillos. 2004. Propagación *in vitro* de caoba (*Swietenia macrophylla* King) a partir de yemas axilares. *Acta Científica Venezolana* 55: 7-12.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 1998. *Plant physiology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, USA. 792 p.
- Van Groenendaal, J. M., S. H. Bullock and L. A. Pérez J. 1996. Aspects of the population biology of the gregarious tree *Cordia elaeagnoides* in a Mexican tropical deciduous forest. *Journal of Tropical Ecology* 12: 11-24.
- Zhang, L., Y. Hu, S. Yan, H. Li, S. He, M. Huang and L. Li. 2012. ABA-mediated inhibition of seed germination is associated with ribosomal DNA chromatin condensation, decreased transcription, and ribosomal RNA gene hypoaacetylation. *Plant Molecular Biology* 79:285-293.
- Zhao, Y. and K. H. Hasenstein. 2009. Primary root growth regulation: the role of auxin and ethylene antagonists. *Plant. Growth Regulation* 28: 309-320.

