

Establecimiento *in vitro* de semillas de una especie con importancia maderera y melífera del Bosque Atlántico

In Vitro Multiplication of Seeds of a Species with Timber and Honey Importance from the Atlantic Forest

Evelyn Duarte

Ingeniera Forestal y Doctora en Recursos Naturales. Profesora de la Universidad Nacional de Misiones, Argentina
evelyn.duarte@fcf.unam.edu.ar | <https://orcid.org/0000-0003-3331-4447>

Citation: Duarte, E. (2024). Establecimiento *in vitro* de semillas de una especie con importancia maderera y melífera del Bosque Atlántico. *Mutis*, 14(1), 1- 9. <https://doi.org/10.21789/22561498.2073>

Recibido: 3 de marzo de 2023
Aceptado: 7 de junio de 2023

Copyright: © 2024 por los autores. Licenciado para *Mutis*. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

RESUMEN

Cordia trichotoma (Vell.) Arrab. ex Steud es una especie arbórea que crece naturalmente en los países de Argentina, Brasil y Paraguay, que se encuentra en estado de conservación vulnerable, debido a la sobreexplotación con fines comerciales por poseer una madera de interés industrial. Con el objetivo de establecer un protocolo de multiplicación *in vitro* de *Cordia trichotoma*, frutos con y sin escarificación física fueron sometidos a desinfección con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 30 volúmenes al 50% durante 5 días, etanol 70% durante un minuto e hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 y 2% durante 20 minutos. Posteriormente, frutos o semillas fueron cultivados en medio basal compuesto de las sales minerales de Murashige y Skoog, con una concentración de sacarosa de 30 gr.L⁻¹, semisólido (agar 6,5 gr.L⁻¹), e incubados durante un mes a 27±2 °C y 16 horas de luz. El uso del H₂O₂ al 50% durante 5 días, combinado con diferentes concentraciones de NaClO y cultivando las semillas 0 frutos resulta en alto niveles de desinfección en donde más del 80% de los cultivos no presentaron contaminación visible, la CG fue del 33,33±23,09 al 90±10,00 % y el IVG fue de 0,13±0,09 a 0,57±0,03 semillas por día. El uso del H₂O₂ en la desinfección de frutos de *C. trichotoma*, es fundamental para eliminar la mayor cantidad de microorganismos que interfieren en el normal desarrollo de las plantas germinadas *in vitro*. La utilización de este desinfectante conjuntamente con el NaClO logró altos porcentajes de germinación, en tanto que la escarificación mecánica influye negativamente sobre el establecimiento de las semillas de *Cordia trichotoma*.

Palabras clave: *Cordia trichotoma*; Desinfección; Germinación; Peróxido de hidrogeno; ciencias naturales.

ABSTRACT

Cordia trichotoma (Vell.) Arrab. ex Steud is an arboreal species that grows naturally in the countries of Argentina, Brazil and Paraguay. It is in a vulnerable state of conservation due to its overexploitation for commercial purposes given the industrial quality of its wood. The objective of this research was to establish an *in vitro* multiplication protocol for *Cordia trichotoma*. For this reason, its fruits, with and without physical scarification, were subjected to disinfection with 30 volumes of 50%

hydrogen peroxide (H₂O₂) for 5 days, 70% ethanol for one minute, and 1 and 2% sodium hypochlorite (NaClO) for 20 minutes. Subsequently, fruits or seeds were cultivated in a basal medium composed of Murashige and Skoog mineral salts, with a sucrose concentration of 30 gr.L⁻¹, semisolid (6.5 gr.L⁻¹ agar) and incubated for a month at 27±2°C and 16 hours of light. The use of 50% H₂O₂ for 5 days, combined with different concentrations of NaClO and cultivating the seeds or fruits resulted in high levels of disinfection, so that more than 80% of the crops did not present visible contamination, the CG was 33.33±23.09 at 90±10.00% and the IVG was 0.13±0.09 to 0.57±0.03 seeds per day. The use of H₂O₂ in the disinfection of *Cordia trichotoma* fruits was essential to eliminate the greatest number of microorganisms that interfere with the normal development of *in vitro* germinated plants. The use of this disinfectant together with NaClO achieved high germination percentages, while mechanical scarification negatively influenced the multiplication of *Cordia trichotoma* seeds.

Keywords: *Cordia trichotoma*; Disinfection; Germination; Hydrogen peroxide; Natural sciences.

INTRODUCCIÓN

Cordia trichotoma es una especie arbórea de la familia Boraginaceae nativa del Bosque Atlántico, región que se distribuye en los países de Argentina, Brasil y Paraguay (da Silva *et al.*, 2022). Es de gran valor ambiental y altamente apreciada en el comercio por su madera, debido a que posee buenas propiedades físicas y mecánicas (da Silva Zanchetta *et al.*, 2020; Gonçalves *et al.*, 2022).

La alta demanda de madera de *C. trichotoma* ha dado lugar a un aprovechamiento selectivo de los mejores individuos, disminuyendo drásticamente el número de ejemplares de las poblaciones existentes. Esta sobreexplotación de la especie en conjunto con otros inconvenientes que presentan sus semillas, como pérdida de viabilidad en 60 días, además de ser altamente afectadas por el coleóptero *Amblycerus longesuturalis* que se alimenta de sus semillas (Eibl *et al.*, 1994; Rodrigues *et al.*, 2007, Duarte *et al.*, 2014; Fleck *et al.*, 2019), al mismo tiempo que se recomiendan una escarificación mecánica para facilitar su germinación (Fowler y Bianchetti, 2000). El conjunto de estos sucesos ha llevado a generar una disminución de la variabilidad genética en la especie (Eibl *et al.*, 1994).

Frente a la alta deforestación que sufren los bosques, y la gran cantidad de especies que se encuentran en la lista roja debido a sobreexplotación y demás factores negativos que afectan a las distintas especies arbóreas, se puede pensar en el uso de la biotecnología como una herramienta que aporte soluciones a los rezagos que presentan las distintas especies importantes en el sector económico y ambiental (Lima-Jiménez, 2018); por lo que es imprescindible la implementación de bancos de germoplasma *in situ* y *ex situ* de especies nativas. Desde este punto de vista son importantes las investigaciones en el área del cultivo *in vitro* de especies nativas como herramienta para el enriquecimiento y conservación de las poblaciones en riesgo (Luna, 2013).

El cultivo *in vitro* es una metodología que permite la multiplicación de plantas forestales de buena calidad con un alto nivel sanitario en un corto tiempo (Ancasi-Espejo *et al.*, 2023). Sin embargo, para llevar a cabo y con éxito esta técnica se debe contar con protocolos de establecimiento *in vitro* de explantes (semillas o

fragmentos de plantas), los cuales podrían emplearse posteriormente para realizar los distintos tipos de multiplicación vegetativa como, por ejemplo, la organogénesis (Duarte *et al.*, 2017; Campos-Ruiz *et al.*, 2020; Duarte, 2022). Para lograr la desinfección de semillas para su germinación *in vitro*, se suelen utilizar diferentes tipos de desinfectante como el etanol, el hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrógeno (Duarte *et al.*, 2014; Nandi *et al.*, 2017), los cuales ya han demostrado su eficiencia en varias especies del Bosque Atlántico en el establecimiento *in vitro* de semillas (Duarte *et al.*, 2014; Duarte *et al.*, 2017; Duarte, 2022).

Una vez contando con material *in vitro* se puede realizar propagación masiva de plantas (García-González *et al.*, 2021), haciendo de esta manera que el cultivo *in vitro* a gran escala pueda contribuir a satisfacer a futuro las demandas madereras, así como la reforestación de áreas que se han visto afectadas por el hombre implementando investigaciones con las que podamos obtener individuos con características superiores y resistencia al ataque de insectos (Juárez-Gómez, 2008). Por otro lado, contar con material de germoplasma con fines de producción y conservaciones de especies leñosas es sumamente importante, ya que para tener éxito en los programas de reforestación y de plantaciones, dependen del abastecimiento de material de calidad (Flores *et al.*, 2019).

Con la finalidad de generar información y un protocolo de establecimiento *in vitro* de semillas de *C. trichotoma*, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del uso de peróxido de hidrógeno combinado con la escarificación física y dos dosis de hipoclorito de sodio en el establecimiento *in vitro* de semillas de *C. trichotoma*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las semillas de *C. trichotoma* fueron recolectadas de árboles élite de la reserva de Uso Múltiple Guaraní (26°54'-59'S y 54°12'-18' W). Luego fueron conservadas a 4 °C hasta el inicio de las experiencias, que fueron llevadas a cabo en el laboratorio de Propagación Vegetativa de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de Misiones. Los 3 árboles élite de los que se cosecharon las semillas corresponden a ejemplares semilleros que se utilizan para el banco de germoplasma de semillas de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de Misiones; por lo tanto, las características de esos árboles corresponden buen estado sanitario, fustes rectos, frondosos, con amplia producción de semillas de calidad y ubicados en una reserva natural protegida por la institución antes mencionada.

Escarificación física y desinfección de frutos (semillas)

A los frutos se les realizó una escarificación física con una lija de granulometría de 120 y, posteriormente, fueron sometidos a una imbibición en una solución acuosa de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) 30 volúmenes al 50% durante 5 días. A continuación, se lavaron con etanol (70%) durante 1 minuto e hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 y 2% con dos gotas de Tween 20® por 20 minutos; finalizado el lavado con los desinfectantes, los frutos se enjuagaron tres veces con agua destilada

estéril. Los frutos y semillas se cultivaron individualmente en tubos de vidrio de 10 mL de capacidad conteniendo 3 mL de una solución nutritiva compuesta por las sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) en su concentración original (MS), con 30 gr.L⁻¹ de sacarosa y 6,5 gr.L⁻¹ de agar libre de reguladores del crecimiento. Los cultivos fueron incubados durante 45 días en condiciones de luz (116 μmol·m⁻²·s⁻¹, PAR, fotoperíodo 14 hs) y temperatura (27±2 °C) controladas. Transcurridos los 45 días se evaluó la capacidad germinativa (CG) que es el porcentaje de semillas germinadas y el índice de velocidad de germinación (IVG) según la fórmula propuesta por Maguire (1962):

$$IVG = \sum_{n=1}^n \frac{G_i}{N_i}$$

Donde G_i es el número de semillas germinadas y N_i la cantidad de días en el cual germinaron.

Análisis estadístico

Se realizaron 4 tratamientos de los cuales a dos se le realizaron escarificación física. Después fueron sumergidas en H₂O₂ y, a continuación, se emplearon dos dosis diferentes (1 y 2%) de NaClO. Los tratamientos restantes no recibieron escarificación física y se desinfectaron directamente con H₂O₂ e NaClO con las mismas dosis que los otros tratamientos. Transcurridos los 45 días se evaluaron las variables CG, IVG y porcentaje de contaminación. Los diferentes tratamientos se organizaron en un diseño completamente aleatorizado con cuatro tratamientos y tres réplicas de 10 semillas cada una. Los datos de las variables estudiadas fueron sometidas a un análisis de variancia (ANDEVA) y las medias de los tratamientos comparadas entre sí por medio del test de comparaciones múltiples de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizándose el software INFOSTAT Versión 2020 (Di Rienzo *et al.*, 2020).

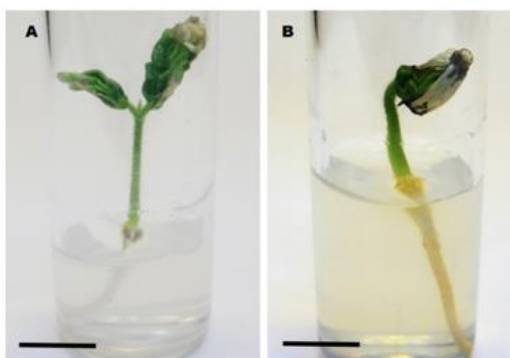
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los resultados indicó diferencias estadísticamente significativas ($P=0.0001$) en el tratamiento 2 frente a los demás. Cabe destacar que el uso combinado de escarificación física de la semilla con una alta dosis de NaClO en este tratamiento resultó en una baja eficiencia en la CG de las semillas (Tabla 1). Por otro lado, el uso del H₂O₂ al 50% durante 5 días, combinado con diferentes concentraciones de NaClO y cultivando tanto el fruto como las semillas resulta en alto niveles de desinfección, en donde los cultivos no presentaron contaminación visible en un 87 a 90% en todos los tratamientos. Si bien la CG fue superior al 30% y el IVG 0,13 a 0,57 semillas por día, una baja dosis de NaClO y la eliminación del pericarpio combinado con el H₂O₂ manifestó la mayor CG e IVG, pero sin diferencia significativa con el tratamiento de escarificación física, cultivo de fruto y misma dosis de los desinfectantes (Tabla 1; Figura 1A-B).

Tabla 1: Efecto de los diferentes tratamientos desinfectantes en el establecimiento *in vitro* de frutos y semillas de *C. trichotoma*.

Tratamiento	Escarificación física	H ₂ O ₂ (%)	NaClO (%)	Explante	CG (%)	IVG (semillas/día)
1	CEF	50	1	Fruto	70,00±11,55a	0,27±0,02a
2	CEF	50	2	Fruto	33,33±23,09b	0,13±0,09a
3	SEF	50	1	Semilla	90,00±10,00a	0,56±0,10a
4	SEF	50	2	Semilla	86,67±5,77a	0,57±0,03a

Letras distintas implican diferencias significativas. CEF: con escarificación física con lija. SEF: sin escarificación física con lija. CG: capacidad germinativa. IVG: índice de velocidad de germinación.

Figura 1. Geminación de semillas (A) y frutos (B) de *C. trichotoma* sin (A) y con escarificación mecánica (B). Escala 0,5 mm.

La combinación de ambos desinfectantes manifestó bajos porcentajes de infección en los cultivos (10,00±1,10 a 13,33±5,77 %). Por lo tanto, el H₂O₂ y el NaClO en la desinfección de frutos de *C. trichotoma*, han sido eficientes en la eliminación de microorganismos causantes de la contaminación *in vitro*. Así mismo, el cultivo directo de semillas fue más apropiado que el cultivo de frutos con escarificación física.

Tanto los frutos como las semillas, que están contenidas dentro del fruto, poseen una alta cantidad de contaminantes; sin embargo, estos patógenos fueron mayormente eliminados cuando en el proceso de desinfección se emplea una solución de H₂O₂. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los datos reportados por Duarte *et al.*, (2014): el uso del peróxido de hidrógeno y la eliminación del pericarpio son fundamentales para lograr la germinación *in vitro* de las semillas de *C. trichotoma*. Así mismo, no es necesario realizar escarificación física, ya que esta puede ocasionar daños a las semillas, y las mismas pueden verse afectadas aún más con los desinfectantes empleados, efectos que pueden observarse en la disminución de la germinación (Tabla 1).

Para tener éxito en el proceso de germinación *in vitro*, la desinfección de las semillas tiene que ser efectiva en la eliminación de microorganismos que imposibilitan el establecimiento y, además, conservar la viabilidad de las mismas, ya que las plántulas que intentan establecerse en el medio de cultivo cuando no son desinfectadas debidamente compiten conjuntamente con microorganismos por

nutrientes, y si estas son sometidas a tratamientos de desinfección con dosis elevadas de NaClO por tiempos prolongados generan un efecto tóxico sobre las semillas (García-Ramírez *et al.*, 2007; Lima-Jimenez *et al.*, 2018). Sin embargo el incremento de este desinfectante ocasiona que el porcentaje de semillas germinadas sea inversamente proporcional a la contaminación de hongos (García-Ramírez *et al.*, 2007).

El H₂O₂ es una solución eficaz, económica y de fácil utilización, ya que puede reducir notablemente la presencia de patógenos de las semillas y, a su vez, contribuye al desarrollo de raíz, hojas y tallos, mejorando de esta manera el vigor y la germinación de estas. En definitiva, favorece a una producción de plantas con mejor calidad (Nandi *et al.*, 2016; Santillán *et al.*, 2023).

El uso de H₂O₂ en la desinfección de semillas, además de ser efectivo en la eliminación de agentes contaminantes, su efecto promotor en la germinación de semillas forestales (Khrizi *et al.*, 2022) es debido a que las moléculas del H₂O₂ se degradan en agua y liberan oxígeno molecular sin dejar residuos tóxicos. Esto genera un aumento de la permeabilidad del agua que promueve la activación de enzimas y reacciones sintéticas esenciales involucradas con el crecimiento de la raíz. Este compuesto es altamente favorable en el establecimiento *in vitro* de semillas, pero debe ser cauto con las concentraciones empleadas porque elevadas dosis pueden provocar quemaduras a los tejidos expuestos al H₂O₂ (Santamaría-Jiménez, 2012; Santillán *et al.*, 2023).

Contar con un establecimiento *in vitro* de semillas es importante porque permite la utilización de material juvenil en la micropropagación y esto es fundamental en las especies leñosas porque, a medida que aumenta en edad los explantes, estos liberan mayor cantidad de compuestos fenólicos al medio, que posteriormente dañan la base del explante y dificultan la absorción de nutrientes y fitoreguladores, afectando negativamente la sobrevivencia de los mismos (Thomas y Ravindra, 1997; Duarte *et al.*, 2016).

CONCLUSIÓN

El uso del H₂O₂ en la desinfección de frutos de *C. trichotoma* es fundamental para eliminar la mayor cantidad de microorganismos que interfieren en el normal desarrollo de las plantas germinadas *in vitro*. La utilización de este desinfectante en conjunto con el NaClO logró altos porcentajes de germinación y bajos niveles de infección. La escarificación mecánica con lija combinado con la utilización de H₂O₂ y 2 % de NaClO afectan negativamente la germinación.

REFERENCIAS

Ancasi-Espejo, R. G., Muñoz-Guzmán, I. y Alcázar-Vivado, J. A. (2023). Modificaciones del medio de cultivo con meta-topolina para la multiplicación *in vitro* de la *Bertholletia excelsa* bonpl. En *Recursos naturales y medio ambiente: alternativas de conservación sostenible en la amazonia boliviana* (pp. 34-42). Editora Científica digital. <https://doi.org/10.37885/221211421>

Campos-Ruiz, J., Arteaga-Cuba, M., Campos-Ruiz, S., Chico-Ruiz, J. y Cerna-Rebaza, L. (2020). Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación *in vitro* de "caoba" *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Arnaldoa*, 27(1), 141-156.

da Silva, M. K. F., Siqueira, D. P., de Carvalho, G. C. M. W., de Deus Silva, R., da Rocha Silva, R. M., & Barroso, D. G. (2022). Hydrogen peroxide enhanced indole-3-butyric acid effects on *Cordia trichotoma* adventitious rooting. *Rhizosphere*, 22, 100533. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100533>

da Silva-Zanchetta, L., Bandera, E., de Souza-Mangini, T., Candaten, L., Iora, A. M., Trautenmüller, J. W., Trevisan, R. & Eloy, E. (2020). Massa específica e teor de umidade ao longo do fuste para *Cordia trichotoma* e *Cordia americana* e suas correlações. *Holos Environment*, 20(4), 496-506. <https://doi.org/10.14295/holos.v20i4.12399>

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. (2020). InfoStat, versión 2020, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <https://www.infostat.com.ar/>

Duarte, E. R. (2022). Regeneración de yemas adventicias en segmentos de hojas y entrenudos de *Balfourodendron riedelianum* (Engl.) Engl. *Colombia forestal*, 25(1), 67-76. <https://doi.org/10.14483/2256201X.17767>

Duarte, E. R., Acevedo, R. M., Sansberro, P. A. y Luna, C. V. (2014). Detección de daño del coleóptero *Amblycerus longesuturalis* para la selección y germinación *in vitro* de semillas de Peteribí (*Cordia trichótoma* [Vell.] Arrab. ex Steudel). *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 113 (1), 18-27

Duarte, E. R., Rocha, S. P. y Niella, F. O. (2017). Cultivo *in vitro* de embriones cigóticos: una estrategia de conservación para *Austrochthamalia teyucuarensis* HA Kellner. *Revista Forestal Yvyrareta*, 24, 51-56.

Duarte, E., Sansberro, P. y Luna, C. (2016). Micropropagation of *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos from seedling explants. *African Journal of Biotechnology*, 15(25), 1292-1298. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.15194>

Eibl, B., Silva, F., Carvalho, A., Czerepak, R. y Kehl, J. (1994). Ensayos de germinación y análisis cuantitativo en semillas de especies nativas de Misiones, R. A. *Revista Forestal Yvyrareta*, 5(5), 33-48.

Fleck, M. D., Costa, E. C., Araujo, M. M., Schoeninger, K., Machado, L. M., Silva, J. M. D., Pedron, L., Do Nascimento Machado D. & Boscardin, J. (2019). Occurrence of *Amblycerus* species in *Cordia trichotoma* seeds and their influence on germination. *Revista Brasileira de Entomologia*, 63, 212-216. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2019.05.007>

Flores, A., Romero-Sánchez, M. E., Pérez-Miranda, R. y Pineda-Ojeda, T. (2019). *Nolina parviflora*, desinfección de semilla y su implicación en la conservación. *Mitigación del Daño Ambiental Agroalimentario y Forestal de México*, 5(6), 109-121.

Fowler, J. A. P. & Bianchetti, A. (2000). *Dormência em sementes florestais*. Colombo, Brazil: Embrapa Florestas.

García, A. F., Moctezuma, J. G. Á. y Ambris, A. C. (2008). Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (HBK) Hemsl. *Foresta Veracruzana*, 10(2), 27-33.

García-González, D. A., Santos-Díaz, M. D. S., Flores-Margez, J. P. & Osuna-Ávila, P. (2021). Effects of the growth regulators for the induction of somatic embryos from different explants of *Echinocactus parryi* Engelm., an endemic and endangered species. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales*, 27(3), 431-447. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2020.08.053>

García-Ramírez, Y., Freire-Seijo, M., Tejeda, M. y Reyes, M. (2007). Germinación *in vitro* de semillas de *Dendrocalamus strictus* (Rosb.) Nees. *Biotecnología Vegetal*, 7(1).

Gonçalves, D. S., Teixeira, G. C., Souza, D. M. S. C., Faria, J. C. T., Molinari, L. V., & Brondani, G. E. (2022). Emission of epicormic shoots and *in vitro* establishment of *Cordia trichotoma* selected adult trees. *Revista Bosque*, 43(2), 169-177. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002022000200169>

Juárez-Gómez, J. (2008). *Desarrollo de un protocolo para la micropropagación de cedro rojo (Cedrela odorata L.) empleando biorreactores de inmersión temporal BIOMINT®* [Disertación de grado para obtener el título de ingeniero químico]. Instituto Tecnológico Superior de Acayucan.

Khrizi, A., Zitouni-Haouar, F.E. H. y Fortas, Z. (2022). Promoción del crecimiento y colonización micorrízica de argán (*Argania spinosa* (L.) Skeels) inoculado con la trufa comestible del desierto *Tirmania nivea* (Desf.) Trappe. *Peer J*, 10, e13769. <https://doi.org/10.7717/peerj.13769>

Lima-Jiménez, N. R., Moreno Serrano, J. A., Eras Guamán, V. H., Minchala Patiño, J., González Zaruma, D., Yaguana Arévalo, M. y Valarezo Ortega, C. (2018). Propagación *in vitro* de *Cinchona officinalis* L a partir de semillas. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 20(2), 169-178. <https://doi.org/10.18271/ria.2018.361>

Luna, C. V. (2013). Cambios en el uso y conservación de los ecosistemas forestales nativos en Argentina: Estado del arte. *BioScriba*, 6(1), 42-50.

Murashige, T. & Skoog F.A. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Nandi, M., Pervez, Z., Alam, M. S., Islam, M. S. & Mahmud, M. R. (2017). Research article effect of hydrogen peroxide treatment on health and quality of chilli seed. *International Journal of Plant Pathology*, 8(1), 8-13. <https://doi.org/10.3923/ijpp.2017.8.13>

Rodrigues, R., Gandolfi, S., Nave, A. & Brancalion, P. (2007). Informações sobre coleta, beneficiamento, Armazenamento e quebra de dormência de espécies florestais nativas. Capacitação para viveiros fornecedores do Clickárvore - SOS – Mata Altântica. 36.

Santamaría-Jiménez, A. L. (2012). Establecimiento de un protocolo para la germinación *in vitro* e inducción a callo embriogénico de cedro (*Cedrela montana*) a partir de embriones zigóticos. Disertación de grado para obtener el título de ingeniería en biotecnología. Sangolqui Ecuador. P.115

Santillán, L. F. J., García, S. A. L. & Benito, H. E. (2023). Uso de peróxido de hidrógeno en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(1), 9452-9461. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i1.5151

Thomas, P. & Ravindra, M. B. (1997). Shoot tip culture in mango: Influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. *Journal of Horticultural Science*, 72(5), 713-722. <https://doi.org/10.1080/14620316.1997.11515563>