



Revista Colombiana de Biotecnología

ISSN: 0123-3475

revcbib_bog@unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia

Colombia

Freire, Rodrigo; Carnevale, Nélida J.; Alzugaray, Claudia; Bueno, Mirian S.
Cultivo in vitro de *Schinus fasciculata* (Griseb) J.M. Johnst var. *fasciculata* (molle)
Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XVI, núm. 2, diciembre, 2014, pp. 169-173
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77632757020>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Cultivo *in vitro* de *Schinus fasciculata* (Griseb) J.M. Johnst var. *fasciculata* (molle)

In vitro culture of *Schinus fasciculata* (Griseb) J.M. Johnst var. *fasciculata* (molle)

Rodrigo Freire **, Nélica J. Carnevale **, Claudia Alzugaray *, Mirian S. Bueno *

Resumen

Schinus fasciculata es un árbol de la ecorregión chaqueña argentina. Es una especie de bajo porte, usada como antiséptico, analgésico, antiinflamatorio y antifúngico. Estudios previos registraron baja germinación y deficiente sanidad. El objetivo fue evaluar la germinación y la respuesta de las plántulas *in vitro* en dos medios de cultivo. Se recolectaron frutos, se desinfectaron por 20 min con HClNa y se sembraron en agar-agua. Las plántulas se repicaron a medio MS en dos diluciones: un cuarto (MS ¼) y un medio (MS ½). Se hicieron ensayos de germinación y vigor (tiempo medio de germinación máxima en días). Se evaluó % de contaminación. A los 20 días del repique se evaluó % de explantos con hojas, número de hojas y altura de plántulas. Paralelamente se hizo un ensayo de germinación y vigor en arena. La contaminación fue de 16 %, la germinación de 84 %, el vigor de 4,9 días. El 94 y el 100 % de los explantos en MS ¼ y MS ½ presentaron hojas. El número promedio de hojas fue de 7,5 y 7,4 y la altura promedio fue de 3,35 cm y 2,98 cm en MS ¼ y MS ½, observándose diferencias significativas en altura. La germinación en arena fue de 46 % y el vigor de 4,6 días. La utilización de la técnica de cultivo *in vitro* en *S. fasciculata* facilita la multiplicación de esta especie de alto valor farmacológico, permitiendo aumentar el porcentaje de frutos germinados y obtener plántulas libres de patógenos todo el año.

Palabras clave: *Schinus fasciculata*, germinación, vigor, cultivo *in vitro*.

Abstract

Schinus fasciculata is a tree of Argentina Chaco eco-region. It is a low-growing species, used as an antiseptic, analgesic, anti-inflammatory and antifungal. Previous studies reported low germination and poor health. The object of this work was to evaluate the germination and *in vitro* response of seedlings in two culture media. Fruits were collected, disinfected for 20 min with HClNa and sowing in agar – water. The seedlings were seeded onto MS medium in two dilutions: fourth (¼ MS) and half (½ MS). Germination and vigor tests (mean time to maximum germination in days) were made. Contamination percentage was evaluated. At 20 days of transplanted were evaluated: % of explants with leaves, leaf number and height of seedlings. Parallel assay germination and vigor in sand was made. Contamination was 16%, germination was 84% and vigor 4.9 days. The 94 and the 100% of the explants in MS ¼ and ½ MS showed leaves. The average leaf number was 7.5 and 7.4 and the average height was 3.35 cm and 2.98 cm in MS ¼ and MS ½, with a significant difference in height. Germination in sand was 46 % and vigor was of 4.6 days. The technique of *in vitro* culture in *S. fasciculata* facilitates the multiplication of this species of high pharmacological value, allowing to increase the percentage of germination and obtain pathogen-free all year seedlings.

Key words: *Schinus fasciculata*, germination, vigor, *in vitro* culture.

Recibido: abril 15 de 2013

Aprobado: octubre 1 de 2014

* Cátedra de Biología; CIUNR. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. CC 14 (S2125ZAA) Zavalla
miriansbueno@gmail.com

** Cátedra de Ecología

Introducción

Schinus fasciculata es un árbol de la Familia *Anacardiaceae* originario de América del Sur, ampliamente distribuido en Bolivia, Paraguay y Argentina y es típico de la región chaqueña (Burkart y Bacigalupo, 2005). En la provincia de Santa Fe, se lo encuentra en los departamentos General Obligado, Las Colonias, 9 de Julio, San Cristóbal y Vera (Pensiero et al., 2005). *S. fasciculata*, comúnmente llamado “molle”, “molle de curtir”, “molle pispita” y “moradillo” es polígamo dioico, con hojas dimorfas, flores amarillentas en pseudorracimos y sus frutos (también denominados semillas), son drupas globosas de 4 a 5 mm de diámetro de color morado (Burkart y Bacigalupo, 2005). Es una especie rústica, resistente a fríos y sequías, puede llegar a medir entre 1 y 8 m de altura. Sus usos medicinales son diversos, como antiséptico, analgésico, antiinflamatorio en emplastos en casos de fracturas y hernias. Además presenta particular interés por las propiedades antifúngicas y antimicrobianas de sus extractos acuosos (Steibel et al., 2007; Vivot Luppi et al., 2009). Tiene aplicaciones como especie ornamental, en perfumería a partir de la extracción de aceites esenciales de hojas y frutos, para arbolado o cercado, para consumo de los frutos como pimienta por su sabor dulce y picante. En estudios previos se observó que esta especie presentaba baja germinación, entre 20 y 40 %, debido a la gran cantidad de frutos vanos que presenta (Alzugaray y Carnevale, 2009). Esta característica es compartida por otras especies de la misma familia, por ejemplo en *Schinopsis balansae* Engl., la proporción de frutos con semillas viables depende de las condiciones climáticas durante la polinización y el período del llenado del fruto (Alzugaray et al., 2005; González y Vesprini, 2010). En el pistacho (*Pistacia vera* L.), el llenado de los frutos depende de la conducción vascular hacia los óvulos, lo que resulta en distintas proporciones de frutos llenos según la variedad (Polito, 1999). Para *Schinus terebinthifolius* Raddi, un arbolito típico de Brasil, se demostró que la especie funciona como dioica y que la polinización cruzada fue necesaria para lograr frutos con semillas en una proporción de 45 a 56 % (Lenzi y Orth, 2004). Para rescatar la diversidad genética amenazada y como una importante herramienta de mejoramiento genético, resulta necesario estudiar la capacidad de las especies para propagarse vegetativamente, así como desarrollar técnicas para obtener copias génicas (Aparicio et al., 2009). La micropropagación *in vitro* de plantas, permite la propagación de árboles y proporciona una ventaja económica importante a la industria forestal (Attrre y Fowke, 1993; Gupta et al., 1980). Entre otras ventajas permite reducir los largos períodos de maduración y la baja viabilidad de las semillas (Trigiano et al., 1992), requiere poco equipamiento y puede también ser utilizada como conservación de germoplasma a bajo costo (Verzino y Joseau, 2005). Estas técnicas se han utilizado con éxito a partir de explantos juveniles como cotiledones

y secciones nodales de plántulas germinadas *in vitro* para especies nativas de la provincia de Buenos Aires, Argentina, con usos diversos, entre ellos el medicinal (Boeri et al., 2000; Sharry et al., 2011).

Con respecto a la micropropagación de especies de esta familia existen antecedentes de cultivo *in vitro* de *Schinus molle* L. a partir de brotes axilares (Ayala Terán, 2011), de *Schinopsis balansae* Engl. a partir de hojas (Sansberro et al., 2003) y de embriones de *Pistacia vera* entre otras especies (Benmahiou et al., 2009). Para *S. fasciculata* (Bueno et al., 2011) establecieron que la utilización de esta técnica incrementó la germinación respecto a métodos tradicionales.

Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la germinación, el vigor de frutos y el comportamiento *in vitro* de esta especie, en dos medios de cultivo de *Schinus fasciculata*, para la obtención de plantas madre que serán utilizadas posteriormente para micropropagar la especie.

Material y métodos

Durante marzo de 2011 se cosecharon frutos de *S. fasciculata* en la localidad de Vera, Santa Fe (60°18'1.768'' O; 29° 27'5.197'' S) y se dejaron secar a temperatura ambiente en laboratorio. Los frutos coleccionados, luego de la extracción del exo y meso carpo, se desinfectaron durante un minuto en alcohol 96° y 20 min en HClNa al 2% (5,6 g/l de cloro activo), con dos gotas de Tween 20 y se lavaron con agua destilada esterilizada. Se sembraron 98 frutos en agar-agua (AA) y a los 20 días las plántulas obtenidas se repicaron a medio Murashige and Skoog (1962) en dos diluciones: un cuarto (MS ¼) y un medio (MS ½) con 3 % de sacarosa y 0,7 % de agar-agar por litro de medio. Se incubaron a 25°C, con fotoperíodo de 12 hs (dentro del rango de horas de luz en que germina esta especie en el sitio de recolección).

De la siembra en agar-agua se evaluaron: porcentaje de contaminación, porcentaje de germinación fisiológica (protrusión de la raíz primaria), porcentaje de germinación y vigor, expresado como tiempo medio de germinación máxima (TMG) en días. Se entiende por germinación la aparición y el desarrollo de las estructuras esenciales que indican la capacidad de la semilla para producir una plántula normal en condiciones favorables y se expresa como porcentaje de plántulas normales (ISTA, 2003). El TMG se calculó según la metodología de Kotowski (1926), citada por Silva y Nakagawa (1995):

$$TMG = \Sigma CiTi / \Sigma Ci$$

Donde:

Ci = número de semillas germinadas por día.

Ti = número de días desde el comienzo del ensayo en que germinan Ci semillas.

Tras 20 días de incubación se evaluó, el porcentaje de explantos que desarrollaron hojas y a los 45 días: el número promedio de hojas por explanto y la altura promedio de plántulas. Los resultados se compararon con la Prueba de T al 0,05 % (InfoStat, 2012).

Paralelamente a los ensayos *in vitro* se efectuaron ensayos de germinación y vigor en arena (ISTA, 2003). Los frutos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % del valor comercial (5,6 g/l de cloro activo) por 2 min, se lavaron con agua esterilizada y se colocaron a germinar en cajas plásticas transparentes con arena a capacidad de campo. Se realizaron 4 réplicas de 50 semillas cada una y para cada ensayo. Las plántulas se evaluaron cada 7 días durante 2 semanas, según indicaciones del manual de evaluación de plántulas (Association Official Seed Analysts, 1992). Los resultados de la germinación se expresaron como porcentaje de plántulas normales. La prueba de vigor realizada fue el tiempo medio de germinación máxima (TMG), registrándose diariamente durante 15 días la germinación fisiológica. Los ensayos se realizaron en cámaras de germinación con un fotoperiodo de 12 hs y una temperatura de 25°C.

Resultados

El porcentaje de contaminación *in vitro* de semillas sembradas en AA fue de 16%. El porcentaje de germinación fisiológica a los 3 días de la siembra fue de 40% y a los 7 días alcanzó el 84%. El TMG fue de 4,9 días y la germinación final se mantuvo en 84 % a los 11 días del ensayo. En la figura 1 se observa una plántula normal en AA.

En las plántulas cultivadas en ambas diluciones de MS se observó la regeneración de un brote por explanto. El 94% de los brotes en MS ¼ diferenciaron hojas, en el medio con mayor concentración de sales el número de brotes con hojas alcanzó el 100 % (figura 1). El promedio de hojas fue de 7,5 y de 7,4 en MS ¼ y MS ½, sin diferencias significativas. La altura media de los brotes fue 3,35 cm en MS ¼ y 2,98 cm en MS ½, estas

diferencias fueron significativas entre los medios ensayados ($p < 0,05$), tabla 1.

Tabla 1. Regeneración de brotes, diferenciación, número de hojas y altura promedio de los brotes para los medios de cultivo MS 1/4 y MS 1/2

| | Medios de cultivo | |
|-----------------------------|-------------------|--------|
| | MS 1/4 | MS 1/2 |
| Regeneración de brotes | 100 | 100 |
| Diferenciación de hojas (%) | 94 | 100 |
| Número promedio de hojas | 7,5 | 7,4 |
| Altura media de brotes (cm) | 3,35 | 2,98 |

La germinación de plántulas normales en arena fue de 46% y el TMG fue de 4,6 días.

Las plántulas consideradas normales presentaron uno o dos cotiledones, sin daño o con un daño no mayor de un tercio del cotiledón; además del hipocótilo elongado y raíz primaria (figura 1). Las plántulas anormales fueron aquellas que sufrieron apenas emergidas podredumbre provocada por patógeno (ISTA, 2003); plántulas sin raíz primaria, y plántulas con daños mayores a un tercio de los cotiledones (AOSA, 1992). Estas representaron un 30% del total de plántulas (figura 2), el resto no germinó.

Discusión

El protocolo de desinfección fue eficiente para este lote de frutos germinados *in vitro* (16%), ya que en trabajos previos, utilizando el mismo protocolo de desinfección, los frutos contaminados alcanzaron el 60% (Musso *et al.*, 2010), estas diferencias pueden deberse a las condiciones ambientales durante la maduración de los mismos. En *S. balansae*, una especie de la familia Anacardiaceae, típica de los bosques en

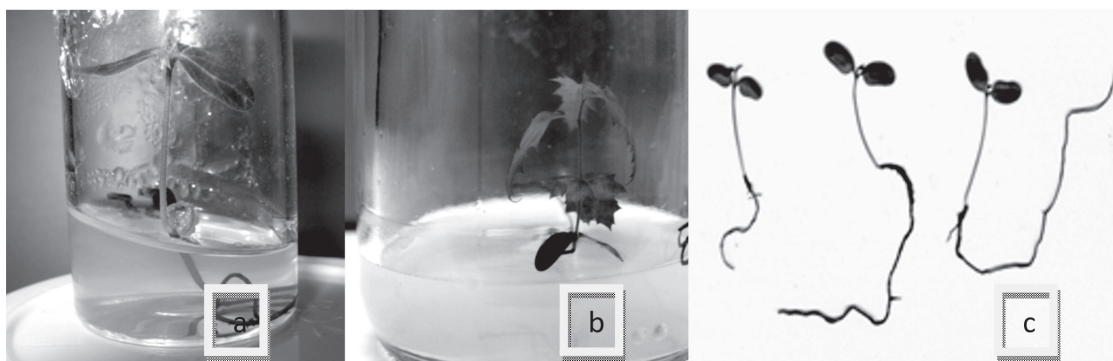


Figura 1. Plántula normal: a-en AA, b- en MS, c- de ensayo de germinación en arena.



Figura 2. Plántula anormal en medio de cultivo.

donde prospera *Schinus fasciculata*, los frutos presentaron mayor contaminación por patógenos fúngicos en años de elevadas precipitaciones entre la floración y la plena madurez. Esto dio como resultado una menor germinación (Alzugaray et al., 2007). Sansberro et al. (2003), trabajando en *Schinopsis balansae*, registraron un porcentaje de explantos contaminados del 30%, siendo el tiempo de exposición en hipoclorito de sodio de 10 min, en lugar de 20 min utilizado en este trabajo. Contaminaciones del 20-30% de los explantos fueron presentados por Rodríguez et al. (2011) en *Gleditsia amorphoides* utilizando 20 min de inmersión en hipoclorito de sodio. Otros autores completan la desinfección con otros desinfectantes como cloruro de mercurio o fungicidas que pueden afectar los cultivos, es el caso de Benmahiou et al. (2009) en *Pistacia vera* y de Rosero (2004) en *Tectona grandis* que agregan Cobox a la desinfección.

Comparando la contaminación durante la germinación *in vitro* y la germinación en arena, se verifica la existencia de mayor contaminación en los ensayos tradicionales, que producen una baja en la producción de plántulas completas (Alzugaray y Carnevale, 2009). Esto puede deberse a que como norma general, en los ensayos tradicionales de germinación, los frutos sembrados no se desinfectan o sólo se desinfectan si existen evidencias de contaminación severa, con el objetivo de que las semillas expresen completamente su potencial (Willan, 1991).

La germinación *in vitro* mostró un elevado porcentaje de plántulas normales emergidas (84%) respecto del ensayo en arena (40%) y de los ensayos informados por otros autores (Alzugaray y Carnevale, 2009), que utilizando métodos tradicionales de producción de plántulas obtuvieron entre un 20-40% de germinación. Las plántulas *in vitro* fueron vigorosas y sanas, ya que a los 7 días la mayor parte de las semillas habían germinado. Estos resultados coinciden con lo observado

por Bueno et al. (2006) para *Maytenus vitis-idaea*, otro arbusto de la región chaqueña, ya que la germinación de las semillas de esta especie en agar-agua aceleró su germinación. Otra especie arbórea de la familia Anacardiaceae, *Pistacia vera* L., mostró un 100 % de germinación sembrada *in vitro* (García et al., 2010).

Los explantos, se comportaron mejor en medio diluido (MS1/4), estos mismos resultados fueron informados por Sansberro et al. (2003) en *Schinopsis balansae*. Rodríguez et al. (2001), señalan sin embargo, que en *Gleditsia amorphoides*, las concentraciones más diluidas disminuyen la respuesta *in vitro* de la especie. Alzugaray et al. (2013) señalan que las mayores concentraciones de sales mejoran el crecimiento y la proliferación de hojas en *Schinopsis balansae*.

La presencia de un brote por explanto, puede deberse a que no se utilizaron reguladores vegetales en esta etapa, ya que el objetivo era obtener plantas madres. Para promover la formación de brotes, se podrían haber suplementado los medios con ácido indol acético o cinetina (Rodríguez et al., 2011), o aumentar la concentración de sales en los medios base (Alzugaray et al., 2013).

Conclusiones

La utilización de la técnica de cultivo *in vitro* en *S. fasciculata* facilita la multiplicación de esta especie de alto valor farmacológico, permitiendo aumentar el porcentaje de frutos germinados y obtener plántulas libres de patógenos durante todo el año.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Fundación Ciencias Agrarias de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Referencias bibliográficas

- Alzugaray, C.; Carnevale, N. J.; Salinas, A. R. y Pioli R. 2005. Observations on quality of *Schinopsis balansae* Engl. seeds. *Seed Technology*. (27) 1: 49-58.
- Alzugaray, C.; Carnevale, N. J. 2009. Libro de semillas de especies leñosas autóctonas (Chaco húmedo. Cuña Boscosa santafesina). Ed. Subsecretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente. Provincia de Santa Fe. Ministerio de Aguas, Servicios Públicos y Medio Ambiente. Prov. Santa Fe. P. 112.
- Alzugaray, C.; Giampaoli, J.; Bueno, M. 2013. Germinación *in vitro* de *Schinopsis balansae* Engl. *Quebracho*. 21 (1,2):39-45.
- Alzugaray, C.; Carnevale, N. J.; Salinas, A. R. y Pioli R. 2007. Factores bióticos y abióticos que afectan la calidad de las semillas de *Schinopsis balansae* Engl y *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl. *Revista Iberoamericana de Micología*. 24 (2): 142-147.
- Aparicio, A.; Pastorino, M.; Martínez-Meier, A. 2009. Propagación vegetativa de ciprés de la cordillera, una especie vulnerable del bosque subantártico de Sudamérica. *Bosque*. 30, 1: 18-26.
- Association Official Seed Analysis. AOSA. 1992. *Seedling Evaluation Handbook*. Contribution. 35: 101 pp.
- Attre, S.; Fowke, L. 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 35:1-35.

- Benmahioul, B.; Kaid-Harche, M.; Dorion, N.; Daguin, F. 2009. *In vitro* embryo germination and proliferation of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Scientia Horticulturae*. 122 (2009) 479–483.
- Bueno, M.; Alzugaray, C.; Freire, R.; Badino, D.; Carnevale, N. 2011. Germinación *in vitro* de *Schinus fasciculata* (Griseb) J.M. (molle). VIII Simposio Argentina “La Biotecnología entre nosotros”. Buenos Aires, REDBIO.
- Boeri, P.; Scelzo, L.; Ruscitti, M.; Abedini, W.; Marinucci, L. 2000. Biotécnicas aplicadas a especies forestales nativas. Investigación agraria. *Sistemas y recursos forestales*. (9) 1: 31-44.
- Bueno, M.; Severín, C.; Carnevale, N. J.; Alzugaray, C.; Giubileo, G. 2006. *In vitro* germination and production of *Maytenus vitis-idaea* plants in two culture media. *Molecular Medicinal Chemistry*. 11: 8-9.
- Burkart, A.; Bacigalupo, N. 2005. Flora de la provincia de Entre Ríos. Parte IV Dicotiledóneas Arquiclamideas B: Geraniales a Umbelliflorales. Entre Ríos: Ediciones INTA p. 627.
- Musso, E.; Carnevale, N.; Spotto, N.; Alzugaray, C.; Bueno M. 2010. XII Congreso Anual Soc. Biol. Rosario.
- García, E.; Lorente, P.; Marín, J.A.; Arbeloa, A.; Andreu, P. 2010. Micropropagación e injerto *in vitro* de pistacho. *ITEA-Información Técnica Económica Agraria*. 106 (4): 294-302.
- González, A.M.; Vesprini, J.L. 2010. Anatomy and fruit development in *Schinopsis balansae* (Anacardiaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 67(2): 103-11.
- Gupta, P. K.; Nadgir, A.L.; Mascarenhas, A.F.; Jagannathan, V. 1980. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. *Plant Science letters*. 17: 259-268.
- International Seed Testing Association. 2003. Rules. *Seed Science and Technology*. Zurich. Switzerland.
- InfoStat. 2012. InfoStat v 2012. Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- Lenzi, M. y Orth, A.I. 2004. Caracterizacáo funcional do sistema reprodutivo da Aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), em Florianópolis- Sc- Brasil. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*. 26(2): 198-201.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-497.
- Pensiero, J.F.; Gutiérrez, H.F.; Luchetti, A.M.; Exner, E.; Kern, V.; Brnich, E.; Oakley, L.; Prado, D.; Lewis, J.P. 2005. Flora vascular de la provincia de Santa Fe. Claves para el reconocimiento de las familias y géneros. Catálogo sistemático de especies. Ed. Secretaría de Extensión. Universidad Nacional del Litoral. 403 p.
- Polito, V.S. 1999. Seedlessness and Parthenocarpy in *Pistacia vera* L. (Anacardiaceae): Temporal Changes in Patterns of Vascular Transport to Ovules. *Annals of Botany*. 83: 363-368.
- Rodríguez, V. M.; Vila, S. K.; Rey, H.; Mroginski, L.A. 2011. Organogénesis *in vitro* de *Gleditsia amorphoides* (Leguminosae). *Comunicaciones Científicas y Técnicas UNNE*. 4 p
- Rosero, N. C. 2004. “Micropropagación Clonal de árboles seleccionados de *Tectona grandis* L. (Teca). Disponible en: <http://www.visagesoft.com> Consultado el: 3 de abril de 2012.
- Sansberro, P.; Rey, H.; Mroginski, L.A.; Luna, C. 2003. *In vitro* plantlet regeneration of *Schinopsis balansae* (Anacardiaceae). *Trees*. 17: 542- 546.
- Sharry, S.; Abedini, W.; Basiglio Cordal, M.A.; Briones, V.; Roussy, L.; Stevani, R.; Galarco, S.; Adema, M.. 2011. Food and medicinal value of some forest species from Buenos Aires (Argentina). *Emir. J. Food Agric*. 23 (3): 222-236.
- Silva, J.B.; Nakagawa, J. 1995. Estudo de fórmulas para cálculo da velocidade de germinação. *Informativo ABRATES*. 5(1).
- Steibel, P.E.; Troini, H.O.; Oriani, D.S.; Ardoino, S.M.; Toribio, M.S.; Boeris, M.A.; Toso, R.E. 2007. Banco de extractos vegetales de plantas nativas y naturalizadas de la Provincia de La Pampa. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas*. 6 (5): 278-279.
- Trigiano, R. N.; Geneve, R. L.; Merckle, S.A. 1992. Tissue and cell culture of woody legumes. *Horticultural Review*. 14: 265-331.
- Verzino, G.E.; Joseau, M.J. 2005. El banco nacional de germoplasma de *Prosopis*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UN de Córdoba. 235 p.
- Vivot Lupi, E.P.; Sánchez Brizuela, C.I.; Cacik Jeifetz, F.; Sequin Acosta, C.J. 2009. Tamizaje de la actividad antifúngica de extractos de especies de la flora de Entre Ríos. *Rev. Cubana de Farmacia*. 43(4):74-84.
- Willan, R.L. 1991. *Guía para la manipulación de semillas forestales*. ed. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Estudio Montes FAO 20/2*. 502 pp.