

SOBREVIVENCIA IN VITRO DE SEGMENTOS NODALES DE *Cordia trichotoma*

Maura Isabel Díaz-Lezcano^{1/*}, Angel Manuel Duarte-Asilvera², Luis Gonzalez-Segnana³,
Mirtha Lucía Vera de Ortiz⁴

Palabras clave: contaminación microbiana; oxidación fenólica; peterevy; segmentos nodales; sobrevivencia.

Keywords: microbial contamination; phenolic oxidation; peterevy; nodal segments; survival.

Recibido: 05/01/23


Aceptado: 16/03/23


RESUMEN

Introducción. El presente trabajo se llevó a cabo para evaluar segmentos de *Cordia trichotoma* en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. **Objetivo.** Evaluar la sobrevivencia de segmentos nodales de *Cordia trichotoma* (peterevy) cultivados in vitro. **Materiales y métodos.** Fueron sembrados 80 segmentos nodales en medio Murashige y Skoog (MS) y medio de cultivo MS+CA 2 ml.l⁻¹, distribuidos en unidades experimentales constituidas por 5 segmentos nodales por unidad experimental, expuestos a 4 tratamientos con 4 repeticiones cada uno. El diseño experimental utilizado fue


completamente al azar y las variables evaluadas fueron la contaminación microbiana y oxidación fenólica para determinar la sobrevivencia de los segmentos. El análisis estadístico consistió en ANAVA con un nivel de significancia del 5% y la prueba de Chi cuadrado para el análisis de fidelidad. **Resultados.** Se registró una contaminación microbiana de hasta 20% de segmentos nodales, en tanto que la oxidación fenólica se mantuvo en un rango de 40 a 45%, como la mayor limitante. **Conclusión.** 30 días posteriores a la siembra, la sobrevivencia de los segmentos nodales fue entre 35 a 55%, se verificó que los segmentos con brotes y los segmentos indiferentes de brotación estaban libres de contaminación microbiana y oxidación fenólica, aunque no registraron diferencias estadísticas significativas.

* Autora para correspondencia. Correo electrónico: maura.diaz@agr.una.py


1 Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Paraguay.
 0000-0003-4629-8255.

2 Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Paraguay.
 0000-0002-5723-7864.

3 Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Paraguay.

 0000-0003-2545-1820.

4 Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Paraguay.

 0000-0002-4381-2610.

ABSTRACT

In vitro survival of nodal segments of *Cordia trichotoma*. Introduction. The present work was carried out to evaluate segments of *Cordia trichotoma* in the Biotechnology Laboratory of the Agrarian Sciences Faculty of the National University of Asunción, Paraguay. **Objective.** To evaluate the survival of nodal segments of *Cordia trichotoma* (peterevy) cultivated in vitro. **Materials and methods.** 80 nodal segments were planted in Murashige and Skoog (MS) medium and MS+CA 2 ml.l⁻¹ culture medium, distributed in experimental units consisting of 5 nodal segments per experimental unit, exposed to 4 treatments with

4 replicates each. A completely randomized experimental design was used and in order to determine the survival of the segments microbial contamination and phenolic oxidation were evaluated. Statistical analysis consisted of ANOVA with a 5% significance level and the Chi-square test for fidelity analysis. **Results.** A microbial contamination of up to 20% of nodal segments was recorded, while phenolic oxidation remained in a range of 40 to 45%, as the greatest limitation. **Conclusion.** 30 days after sowing, the survival of nodal segments was between 35 to 55%, it was verified that segments with shoots and indifferent sprouting segments were free of microbial contamination and phenolic oxidation, although no significant differences were found.

INTRODUCCIÓN

Cordia trichotoma (Vell.) Arráb. ex Steudel, conocido en Paraguay como peterevy, es un árbol de la familia Boraginaceae. Esta importante especie pertenece al estrato superior del bosque; posee un fuste recto muy característico aún en plantaciones abiertas, presenta autopoda natural y cuenta con una pequeña y densa copa. Fructifica de julio a septiembre; coloniza rozados (producto de incendios), chacras y sobre todo claros de la selva. Es una especie higrófila y heliófila que necesita aperturas en el dosel para su regeneración natural. Sus semillas pierden rápidamente su poder germinativo (López *et al.* 2002).

Esta especie posee una madera altamente valorada en el mercado nacional e internacional. Es utilizada en la fabricación de muebles finos, ebanistería en general, puertas, marcos, ventanas, revestimientos de interiores y exteriores de casas (Ortega *et al.* 1989), también es empleada en la industria del bobinado, la fabricación de chapas decorativas y pisos parquet (Nuñez *et al.* 2008).

Se destaca por ser una especie melífera (Ortega *et al.* 1989) y de tener cualidades

ornamentales por lo que se utiliza en jardinería, además es adecuada para la reforestación en la recuperación de áreas degradadas (Lorenzi 2008).

Naturalmente la propagación de *C. trichotoma* se produce de forma a partir de semillas (Carvalho 2003) pero presenta algunos inconvenientes, por un lado, se encuentran catalogadas como semillas recalcitrantes (Eibl *et al.* 1994 y Carvalho 2003), disminuyendo su poder germinativo a los 60 días (Marchetti 1984), además de presentar una germinación lenta y despereja (Mendonça *et al.* 2001) lo que dificulta su propagación masiva. Por ello surge como alternativa la micropropagación de las partes vegetativas de las plantas de interés para evitar la variabilidad genética que se tendría con la propagación sexual, además de los problemas de germinación mencionados.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la sobrevivencia de segmentos nodales de *Cordia trichotoma* (peterevy) cultivados in vitro.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de

Asunción, ubicada en el Campus de la Ciudad de San Lorenzo, a 10,5 km de la Ciudad de Asunción, Paraguay.

Las plantas madre de peterevy (*Cordia trichotoma*) donadoras de los segmentos nodales utilizados en el ensayo de micropropagación fueron producidos en el vivero de la Carrera de Ingeniería Forestal de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción con georreferencia 25°20'07.04" S 57°30'54.30" O.

Estas plantas fueron sometidas a un tratamiento de desinfección con la aplicación de fungicida Carbendazim 50%, 5 ml.l⁻¹, e insecticida D.D.V.P. (2,2 dicloro dimetil fosfato) 100%, 1,5 ml.l⁻¹, en combinación con una fertilización foliar (Nitrógeno 8 ppm, Fosforo 15 ppm, Potasio 10 ppm), 10 ml.l⁻¹, para estimular la producción de brotes nuevos que sean libres de microorganismos contaminantes.

Para el ensayo fueron utilizados los segmentos nodales, constituidos por porciones de ramas jóvenes que contienen yemas terminales o laterales, con el objetivo de colocarlas en condiciones adecuadas para que produzcan raíces adventicias y brotes de hojas.

Fueron sembrados 80 segmentos nodales de peterevy. Cada unidad experimental estuvo constituida por 5 segmentos nodales y se evaluaron los porcentajes de contaminación, oxidación y sobrevivencia.

La desinfección de los segmentos nodales se realizó en una cámara de flujo laminar, en condiciones de asepsia, mediante alcohol etílico (C₂H₅OH) al 70% durante 3 minutos, hipoclorito de sodio (NaClO) en concentraciones de 15% y 20% durante 10 minutos, y finalmente enjuagadas con agua destilada estéril 3 veces.

Los segmentos nodales fueron sembrados en tubos de ensayo que contenían medio MS (Murashige y Skoog 1962). Se colocó 1 segmento nodal de 2,5 cm por tubo de ensayo; con un total de 5 individuos, con 4 repeticiones cada tratamiento. Luego de la siembra los tubos de ensayos fueron mantenidos a temperatura constante de 25°C y en condiciones de oscuridad durante los primeros 7 días posteriores a la siembra; una vez

concluida la etapa de oscuridad, los tubos fueron trasladados a una sala de germinación con un fotoperiodo de 16 horas.

El diseño del experimento fue completamente al azar, a partir de 4 tratamientos con 4 repeticiones cada uno. Cada tratamiento estuvo constituido por 5 explantes. Los individuos fueron sometidos a la desinfección en las siguientes concentraciones de NaClO, las cuales están consignadas en la Tabla 1. Así también, los segmentos nodales fueron sembrados en 2 medios de cultivo.

Tabla 1. Tratamientos empleados, tipos de medios y desinfección con NaClO.

Tratamientos	Medio de cultivo	NaClO (%)
T1	Murashige & Skoog	15
T2	Murashige & Skoog + Carbón Activado (2 g.l ⁻¹)	15
T3	Murashige & Skoog	20
T4	Murashige & Skoog + Carbón Activado (2 g.l ⁻¹)	20

La recolección de datos se realizó a los 7, 15, 22 y 30 días posteriores a la siembra de los segmentos nodales. Las variables estudiadas, contaminación microbiana, oxidación fenólica y sobrevivencia, fueron sometidas a un análisis de Varianza (ANAVA). Para el análisis de fidelidad de los datos los resultados fueron sometidos a la prueba de Chi Cuadrada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contaminación microbiana. El tratamiento constituido por fungicida Carbendazim (50%) e insecticida D.D.V.P. (100%) logró mantener las plantas madre de *C. trichotoma* libres de síntomas de microorganismos contaminantes.

Díaz Lezcano *et al.* (2021) manifiestan la necesidad de tratamientos sanitarios a las plantas madre, por lo que afirman que la aplicación de

Oxicloruro de cobre (3 g.l^{-1}) y Ditiocarbamato (2 g.l^{-1}) mantuvo el 100% de los ejemplares de *Handroanthus heptaphyllus*, utilizados posteriormente en la micropropagación de sus segmentos nodales, libres de sintomatología de contaminación microbiana. Asimismo, Niella *et al.* (2014) recomiendan aplicaciones líquidas de 3 g.l^{-1} de Zineb® como fungicida a las plantas madre de *C. trichotoma* a ser propagadas agámicamente.

A los 30 días de siembra de los explantes de *C. trichotoma* desinfectados con hipoclorito de sodio (15%) y sembrados en medio de cultivo MS

(T1) no presentaron indicios de contaminación microbiana. Los explantes sembrados en medio de cultivo MS+CA (2 g.l^{-1}) (T2) y desinfectados con NaClO (15%) presentaron 30% de contaminación por microorganismos. Por su parte, los segmentos nodales sembrados en medio de cultivo MS desinfectados con NaClO (20%) el tratamiento (T3), registró 25% de contaminación microbiana. En el T4, medio de cultivo MS+CA2 (g.l^{-1}), los segmentos nodales desinfectados con NaClO (20%) presentaron 20% de contaminación por microorganismos patógenos (Figura 1).

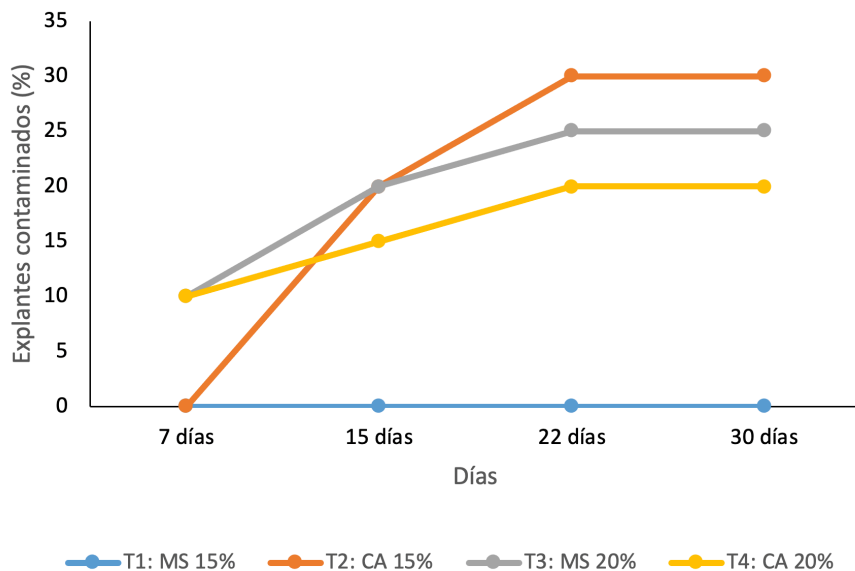


Figura 1. Porcentaje de segmentos de *Cordia trichotoma* contaminados por microorganismos durante 30 días de evaluación.

El análisis de varianza y la prueba de Chi cuadrada revelan que no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos de desinfección a los cuales fueron sometidos los explantes de *C. trichotoma*.

Otras investigaciones obtuvieron favorables resultados con menores concentraciones de NaClO y menor tiempo, las cuales se describen a

continuación. Ayala Jacobo (2012) con *Amburana cearensis* obtuvo un promedio de 19% de contaminación a los 30 días de la siembra de segmentos nodales sometidos a una desinfección en etanol de 96° (70%) durante 3 minutos y luego con hipoclorito de sodio (10%) durante 5 minutos, un aspecto importante de resaltar fue que los plantines de *Amburana cearensis*, utilizados como plantas

madre, fueron pulverizados con fungicida Oxicob (Oxicloruro de cobre al 85%) (3,50 g.l⁻¹) cada 15 días antes de retirar los segmentos de los mismos. Con la misma concentración y tiempo de sumersión en NaClO, Mongelós Franco *et al.* (2020) registraron 100% de sobrevivencia de explantes y ausencia de contaminación microbiana en el tratamiento con NaClO (10%) durante 5 minutos de establecimiento in vitro de meristema apical de *Musa* sp. A diferencia de estas 2 especies, *Amburana cearensis* y *Musa* sp, las cuales son glabras, la especie en estudio en esta investigación, *C. trichotoma*, es pubescente hecho que pudo contribuir en la mayor superficie de contacto para la contaminación microbiana por lo que requirió tanto una mayor concentración de NaClO como tiempo de exposición en el desinfectante.

Por su parte, Zichner Zorz (2012) en cultivo in vitro de segmentos nodales de *Eucalyptus grandis* obtuvo 25% de contaminación por agentes patógenos a los 30 días de la siembra. Las plantas madre proveedoras de los segmentos fueron tratadas previamente al cultivo in vitro con una solución antibiótica de amplio espectro, combinación de Tetraciclina (250 mg) y Bencilamina (50 mg) a una concentración de 1,2 g.l⁻¹, posteriormente al tratamiento de asepsia constituido por etanol 96°

(70%) durante 1 minuto y luego con hipoclorito de sodio (10%) durante 5 minutos. En este contexto, los resultados obtenidos en la presente investigación apuntan a la utilización de mayores concentraciones y tiempo de asepsia en los tratamientos de desinfección de especies forestales.

El tratamiento de plantas madre es recomendado por Velazco *et al.* (2010) quienes aseguran que es posible la desinfección de segmentos nodales de *C. trichotoma*, con el uso de brotes jóvenes recolectados apenas hayan alcanzado los 5 cm de longitud y el empleo de un protocolo de desinfección que utiliza, etanol, tween 20, fungicidas, antibióticos, cloruro de mercurio y cloruro de calcio.

Oxidación fenólica. A los 30 días posteriores a la siembra de los explantes se registró la oxidación fenólica de 60% en el T1. A su vez, el T2 registró 45%, en el T3 y el T4 se observaron 50% de oxidación fenólica cada una (Figura 2). Estos resultados señalan el alto riesgo de oxidación fenólica en los explantes de *C. trichotoma*, el cual no pudo ser controlado con la adición de carbón activado (CA) al medio de cultivo MS, que constituyó la mayor limitación en la propagación in vitro de *C. trichotoma* en el presente estudio.

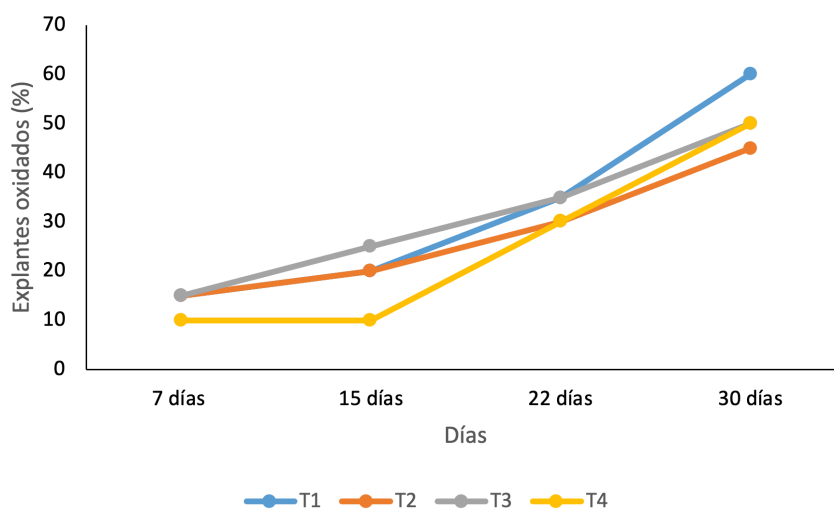


Figura 2. Porcentaje de oxidación fenólica de segmentos nodales de *Cordia trichotoma* durante 30 días de evaluación.

Los análisis estadísticos demostraron que no existen diferencias significativas entre los tratamientos para prevenir la oxidación fenólica de los segmentos nodales de *C. trichotoma*.

Conclusiones similares destacan otras investigaciones, tales como, Díaz Lezcano (2010) en segmentos nodales de *Tabebuia heptaphylla* (sinonimia de *Handroanthus heptaphyllus*), lapa-cho de flores blancas, a los 30 días de siembra, que reportaron un 40% de oxidación con la desinfección con NaClO (5%) y 48% de los explantes con NaClO (10%), ambas concentraciones durante 10 minutos, y posteriormente sembrados en medio de cultivo MS sin la adición de carbón activado (CA), así como tampoco Ayala Jacobo (2012), quien trabajó con *Amburana cearensis* registró un promedio de 10% de oxidación a los 30 días de evaluación, donde los explantes fueron sometidos a una desinfección con hipoclorito de sodio (10%) durante 5 minutos.

Sin embargo, otros autores refieren que la adición de carbón activado en concentraciones de entre 2 y 3 g.l⁻¹ favorecen al control de la oxidación fenólica, como Herbele (2010) manifiesta que al multiplicar microcepas de *C. trichotoma* mantenidas in vitro, sembradas en medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) con adición de 1,5 g.l⁻¹ de carbón activado favoreció la formación y crecimiento de brotes.

Fiori *et al.* (2016) pudieron observar que la dosis de CA (2 g.l⁻¹) logró suprimir la oxidación en explantes de *Acrocomia aculeata* en 2 periodos de incubación lo cual posibilitó de esa manera, la obtención y desarrollo de la totalidad de los embriones cultivados durante al primer cultivo y luego del subcultivo. Asimismo, Díaz Lezcano *et al.* (2021) mencionan que resultó efectivo el

tratamiento de prevención de oxidación 2 g.l⁻¹ de carbón activado al medio de cultivo pues controló hasta el 100% de necrosis de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus*.

En tanto que, Zichner Zorz *et al.* (2014) sostienen que el Carbón Activado 3 g.l⁻¹ controló 100% la oxidación de los tejidos de los explantes de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden cultivados in vitro. Ensayos realizados por Díaz Lezcano *et al.* (2021) demostraron diferencias significativas en el control de la oxidación de *Handroanthus heptaphyllus* de flores blancas, con la concentración de 3 g.l⁻¹ de carbón activado el tratamiento más efectivo.

Por su parte, Díaz Lezcano *et al.* (2016) afirman que en la fase de establecimiento del cultivo in vitro de *Musa* spp. no existieron diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones de 2 y 3 g.l⁻¹ carbón activado en cuanto a la oxidación, resultado que está en la fase de establecimiento en 9,37% y en el primer subcultivo de 8,85%.

Sobrevivencia. Para evaluar la sobrevivencia se consideraron los segmentos nodales que presentaron indicios de brotación y los indiferentes que no brotaron (segmentos libres de contaminación microbiana y oxidación fenólica), por lo que, a los 30 días posteriores a la siembra, se registró que el T1 presentó un total de 60% de explantes sobrevivientes; es decir, explantes libres de contaminación por agentes patógenos y síntomas de oxidación fenólica. A su vez, los segmentos sembrados en medio de cultivo T2 registraron un 40% de explantes sobrevivientes. En el T3 se logró 45% de sobrevivencia, en tanto que los explantes sembrados en el T4 se observó un 55% de sobrevivientes (Figura 3).

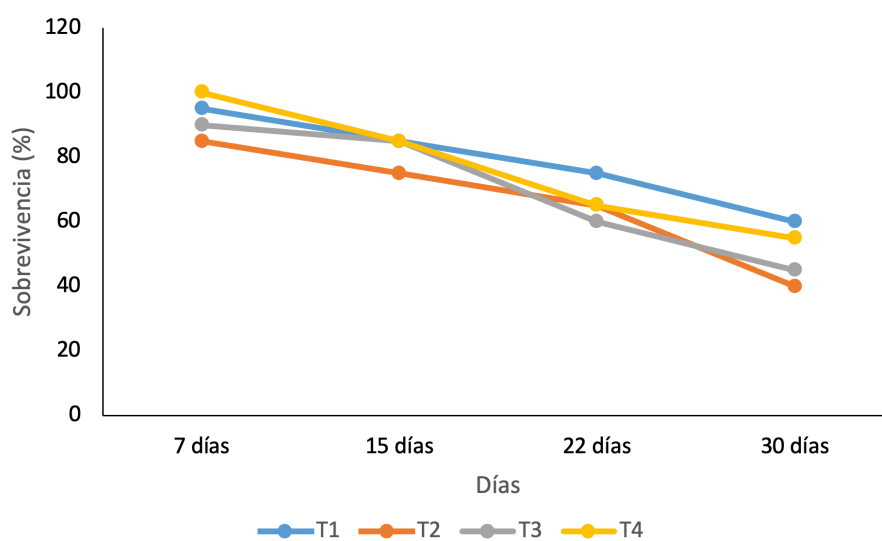


Figura 3. Porcentaje de segmentos de *Cordia trichotoma* sobrevivientes por cada tratamiento durante los días de evaluación.

Mediante el análisis estadístico se determinó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos a los que fueron sometidos segmentos de peterevy. Los resultados de la prueba de Chi cuadrada determinaron que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos para los parámetros estudiados.

La representación gráfica de la distribución de los explantes contaminados por agentes microbianos los cuales se encontraban en un rango de 0 a 20% así como los segmentos oxidados que estuvieron dentro de un rango de 40 a 45% y los sobrevivientes en un rango de 35 a 55% por tratamiento se aprecia en la Figura 4.

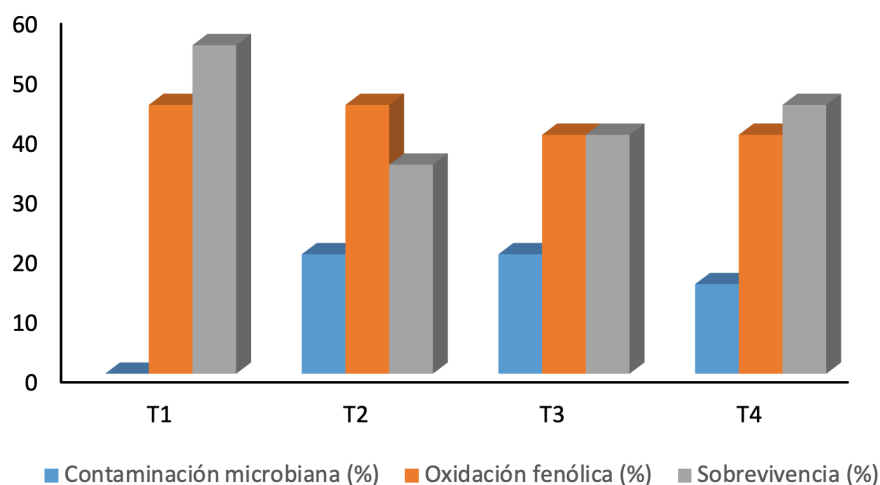


Figura 4. Contaminación microbiana, oxidación fenólica y sobrevivencia de explantes de *Cordia trichotoma* por tratamiento.

Resultados similares fueron reportados en investigaciones realizadas con otras especies forestales, como las de Alarcón (2013), quien al trabajar con segmentos de *Myrocarpus frondosus*, registró a los 30 días de la siembra in vitro 40% de explantes sobrevivientes del total de la siembra; 24% de explantes con formación de brotes, con una longitud promedio de 5,7 mm, y Zichner *et al.* (2014), reportó 61% de sobrevivencia de segmentos nodales de *Eucalyptus grandis*

Hill ex Maiden en su protocolo de establecimiento in vitro.

Fick (2007) afirma que miniesquejes de *C. trichotoma*, de 2,5 a 5,5 cm de longitud, sembrados in vitro en Woody Plant Medium (WPM) líquido demostraron altos porcentajes (entre 80 y 83,3%) de supervivencia, pero no enraizaron.

La Figura 5 expone la secuencia fotográfica de la microporpagación de segmentos nodales de *C. trichotoma* (peterevy).



Figura 5. Secuencia fotográfica de la microporpagación de segmentos nodales de *C. trichotoma*.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en los ensayos de cultivo in vitro de segmentos nodales de *Cordia trichotoma*, se concluye que a los 30 días posteriores a la siembra, se pudo verificar la sobrevivencia de entre 35 a 55% del total segmentos nodales de peterevy, conformados por

explantes con brotes y los segmentos indiferentes de brotación o libres de contaminación microbiana y oxidación fenólica, aunque no registraron diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas, no obstante, la oxidación fenólica fue la mayor limitante en la microporpagación de esta especie.

AGRADECIMIENTO

Las personas autoras agradecen a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción la provisión de los insumos y el equipamiento para la realización de los ensayos.

LITERATURA CITADA

- Alarcón, A. 2013. Efecto del hipoclorito de sodio en el control de la contaminación de segmentos nodales de *Myrocarpus frondosus* Allemão y *Paulownia tomentosa* (Thunb). Steud. establecidos in vitro. Tesis Ingeniería Forestal. San Lorenzo, Paraguay, Universidad Nacional de Asunción. 45 p.
- Ayala Jacobo, L. 2012. Establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Pongamia pinnata* (L.) Pierre. (*Pongamia*) y *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) A.C. Smith. (Trébol). Tesis Ingeniería Forestal. San Lorenzo, Paraguay, Universidad Nacional de Asunción. 74 p.
- Carvalho, PHR. 2003. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília Embrapa Informações Tecnológica Colombo, Brasília, Embrapa Florestas N° 1, 1039 p.
- Díaz Lezcano, MI. 2010. Ensayos preliminares para la micropropagación in vitro de *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (lapacho) de flores blancas. Ka'aguy Revista Forestal del Paraguay 15(1):27-29.
- Díaz Lezcano, MI; Flor Benítez, BA; Enciso Garay, CR; González Segnana, LR. 2016. El carbón activado y las condiciones de oscuridad en la micropropagación de banana variedad Nanição. Revista Colombiana de Biotecnología 18(2):140-146. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.55618>
- Díaz Lezcano, MI; Rodas Ramirez, JM; Gonzalez Segnana, LR; Vera de Ortiz, M. 2021. Control de la oxidación fenólica de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* en condiciones in vitro (en línea). CEDAMAZ 11(1):1-5. Consultado 16 jun. 2023. Disponible en <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/1029>
- Díaz Lezcano, MI; Vera Arza, DM; Gonzalez Espinola, DD; López Talavera, CA. 2021. Micropropagación de *Handroanthus heptaphyllus* (VELL.) Mattos a partir de segmentos nodales. Revista De La Sociedad Científica Del Paraguay 26(1):49-63. DOI: <https://doi.org/10.32480/rsecp.2021.26.1.49>
- Eibl, B; Silva, F; Carvalho, A; Czerepak, R; Kehl, J. 1994. Ensayos de germinación y análisis cuantitativo en semillas de especies nativas de Misiones, R. A. Yvyrareta, Eldorado 5(5):33-48.
- Fiori Fernández, C; Díaz Lezcano, MI; González Segnana, LR. 2016. Enraizamiento in vitro de embiones cigóticos de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. Colombia Forestal 19(1):67-78. DOI: <https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2016.1.a05>
- Heberle, M. 2010. In vitro and ex vitro propagation of louro pardo (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel). Dissertação Mestrado em Recursos Florestais e Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil. 76 p.
- López, J; Little, E; Ritz, G; Rombold, J; Hahn, W. 2002. Árboles comunes del Paraguay: Ñandeyvyra mata kuera. PY, Cuerpo de Paz. se. 425 p.
- Lorenzi, H. 2008. Arvores brasileiras. Manual de indentificacao e cultivo de plantas arvoreas nativas do Brasil. 5 ed. Nova Odessa, Brasil, Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 584 p.
- Marchetti, ER. 1984. Época de coleta, sementeira, tratamento pré-germinativo e métodos de sementeira de espécies florestais cultivadas no Rio Grande do Sul. In Congresso Florestal Estadual, Nova Prata, Brasil, Anais. Nova Prata: [s. n.]. p. 524-532.
- Mendoca, EAF; Ramos, NP; Paula, RC. 2001. Viabilidade de sementes de *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (louro pardo) pelo teste de tretrazólio. Revista Brasileira de Sementes, Pelotas 23(2): 64-71.
- Mongelós Franco, Y; Mussi Cataldi, CE; Duarte Ovejero, NN; Díaz Lezcano, MI. 2020. Protocolo de desinfección para establecimiento in vitro de meristema apical de banana *Musa* spp (en línea). CEDAMAZ 10(2):47-50. Consultado 02 ago. 2022. Disponible en <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/815>
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Phys. Plant. 15:473-493.
- Niella, FO; Rocha, SP; Eibl, BI; Schoffen, CD; Martinez, MS; Conti, P; Franco, M; Ayala, L. 2014. Propagación clonal de *Peltophorum dubium* (caña fistola), *Myrocarpus frondosus* (incienso), y *Cordia trichotoma* (peteribi) para su conservación y domesticación (en línea). Yvyrareta: Revista Forestal País de Árboles 12(21):44-50. Consultado 12 mar. 2023. Disponible en <http://yvyrareta.com.ar/index.php>
- Núñez, N; Mora, A; Santacruz, F. 2008. Aplicación de técnicas de micropropagación de la especie *Cordia elaeagnoides* A. DC. (Boraginaceae). Avances de la investigación Científica en el CUCBA (en línea). Guadalajara, MX. Consultado 30 abr. 2013. Disponible en: [http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances2008/Agronomia/ProduccionAgricola\(pp%201-86\)/NunezSandovalNancy/63-70.pdf](http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances2008/Agronomia/ProduccionAgricola(pp%201-86)/NunezSandovalNancy/63-70.pdf)
- Ortega, E; Spichiger, R; Stutz, L. 1989. Noventa especies forestales del Paraguay. Ginebra, Suiza,

- Conservatoire et Jardin Botaniques de la Ville de Genève. 218 p.
- Velazco, SJE; Rocha, P; Niella, F. 2010. Establecimiento y mutiplicación in vitro de segmentos nodales de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. Ex Steud (Borragináceas) (Nº. 63 Silvicultura). El Dorado, Argentina, Universidad Nacional de Misiones. 13 p.
- Zichner Zorz, A. 2012. Establecimiento de un protocolo para la propagación clonal in vitro de segmentos nodales de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. Tesis Ingeniería Forestal. San Lorenzo, Paraguay, Universidad Nacional de Asunción. 58 p.
- Zichner Zorz, A; Díaz Lezcano, MI; González Segnana, LR; Vera de Ortiz, M. 2014. Efecto del carbón activado en el control de la oxidación de segmentos nodales de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden cultivados in vitro (en línea). *Investigación Agraria* 14(2):107-111. Consultado 25 ago. 2022. Disponible en <https://www.agr.una.py/revista/index.php/ria/article/view/257>