

PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Geranium chilloense* WILLD. EX
KUNTH. PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS COMPLETASCOMPLETE PLANTS *in vitro* PROPAGATION OF *Geranium Chilloense* WILLD. EX
KUNT

Thaly Benavides, Adriana Córdova e Ivonne Vaca*

Universidad Politécnica Salesiana, Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales. Av. 12 de Octubre N42-22 y Wilson, Telf. 3962 800 Ext. 2643, Quito, Ecuador.

*Autor para correspondencia: ivaca@ups.edu.ec

Manuscrito recibido el 14 de marzo de 2016. Aceptado, tras revisión, el 13 de octubre de 2016.

Resumen

Geranium chilloense Willd. ex Kunth es conocida con el nombre de Geranio de los Chillos, es una planta ornamental silvestre, nativa de Los Andes se encuentra distribuida en las quebradas del Distrito Metropolitano de Quito y forma parte de la historia de la flora nativa de Quito ya que ha sido descrita desde la expedición de Alexander Humboldt y Aimé Bonpland en 1802. El presente estudio presenta un protocolo de propagación *in vitro* de *Geranium chilloense* Willd. ex Kunth, para la obtención de plantas completas. Para la germinación *in vitro*, se evaluaron dos escarificaciones, tres protocolos de desinfección y tres concentraciones de sales MS. La escarificación recomendada consiste en tres días de hidratación, seguida de una inmersión de dos horas en una dilución de ácido acético (10%), ya que permitió obtener un porcentaje de germinación del 31%. Para la desinfección se seleccionó el protocolo P3 con etanol al 70% (1 min), hipoclorito de sodio al 20% v/v (1,2 p.a) más tween (20 min), al obtener baja contaminación fúngica (3%). Mientras que, para la introducción al medio de cultivo, se recomiendan las sales MS reducidas al 25% de su concentración, ya que resultó en mayor porcentaje de germinación (41%). Para la multiplicación se evaluaron concentraciones e interacciones de reguladores de crecimiento, se recomienda el uso del tratamiento T2 (AIA 0,5 ppm), ya que logró el mayor número de brotes por explante (3,88). Para la fase de adaptación al sustrato, la turba estéril presentó los mayores porcentajes para la variable prendimiento (81%).

Palabras claves: cultivo de tejidos, *Geranium chilloense*, propagación, reguladores de crecimiento, sales MS, sustratos.

Abstract

Geranium chilloense Willd. ex Kunth is known as "Geranio de los chillos", is an ornamental plant native of Los Andes, that is found in Metropolitan District of Quito's ravines; and, it is part of the history of Quito's native flora because it was described from the expedition of Alexander Humboldt and Aime Bonpland in 1802. This paper presents a protocol for *in vitro* propagation of *Geranium chilloense* Willd. ex Kunth, to obtain complete plants. For germination *in vitro*, two scarification, three protocols of disinfection and three concentrations of salts MS were evaluated. For scarification is recommended three days of hydration, followed by soaking two hours at a dilution of acetic acid (10%) as yielded a germination rate of 31%. For disinfecting, P3 with ethanol 70% (1 min), sodium hypochlorite 20% v / v (1.2 pa) more tween (20 min), was selected to obtain low fungal contamination (3%). While, for introduction into the culture medium, low salt concentrations in MS medium (25%) are recommended, as it resulted in higher germination percentage (41%). For multiplication were evaluated concentrations and interactions of growth regulators, using T2 (AIA 0.5 ppm) was achieved the highest number of shoots per explant (3.88). Finally, for the acclimatization of plants, peat had the highest percentages for rooting (81%).

Keywords: tissue culture, *Geranium chilloense*, propagation, growth regulators, MS salts, substrates.

Forma sugerida de citar: Benavides, T., A. Córdova e I. Vaca. 2016. **Propagación in vitro de *Geranium chilloense* Willd. ex Kunth. para la obtención de plantas completas.** La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 24(2):150-158. ISSN: 1390-3799.

1 Introducción

Geranium chilloense está distribuida a lo largo de Los Andes, entre los 2000 y 4000 m.s.n.m., en Colombia, Ecuador y Perú (Jaramillo, 2013). Es una planta nativa, parte histórica de la flora patrimonial de Quito, ya que fue descubierta en la expedición de Alexander von Humboldt y Aimé Bonpland en el año 1802, cuando residieron en los cantones Quito y Rumiñahui (Ruales y Guevara, 2010).

Esta especie ha sido vagamente documentada, según Aedo, (2012), es una hierba perenne, que alcanza los 26 a 100 cm de altura. Su rizoma tiene forma de nabo, sin raíces fusiformes. El tallo es ascendente, frondoso, sin enraizamiento en los nudos, las hojas basales están dispuestas en roseta, la lámina presenta de 3 a 5 lóbulos con pecíolos de 31 cm de largo, con estípulas. La inflorescencia es una cima monocasio, con sépalos suaves lanceolados y, pétalos erectos, enteros o ligeramente entallado con leves hendiduras, glabros o ciliados en el margen basal, de color púrpura, raramente blancas. El fruto es liso, con semillas que miden de 2 a 2,9 mm de largo, 1 a 1,9 mm de ancho, de color marrón a café.

Actualmente *G. chilloense* ha tomado gran interés como parte de los programas de restauración en las quebradas de la ciudad, mientras que en los espacios públicos y parques es integrada como componente del nuevo paisajismo de Quito (Jaramillo, 2013). La investigación de esta especie representa el fortalecimiento del proceso de apropiación y valoración del patrimonio natural de Quito.

Para la reforestación y ornamentación del Distrito Metropolitano de Quito, el Municipio cuenta con viveros donde propagan especies nativas y exóticas por métodos convencionales, tales como siembra de semillas y cultivo de estacas, alrededor de 300000 plantas por año, cantidad que no abastece la demanda (El Comercio, 2009). Por ello se ha visto la necesidad de implementar otras metodologías de producción de plántulas, mediante el desarrollo de un protocolo *in vitro* de propagación *Geranium chilloense* a partir de semillas colectadas.

2 Materiales y métodos

2.1 Área de Estudio

El proceso de investigación se desarrolló en las instalaciones del Jardín Botánico de Quito (2820 m.s.n.m.), ubicado en el Distrito Metropoli-

tano de Quito, coordenadas N 0° 48' 50"; E 78° 30' 51". Las condiciones experimentales especificadas del cuarto de incubación fueron: Temperatura 15-24°C y Humedad relativa 60%.

2.2 Material vegetal

Las semillas fueron recolectadas en el Jardín Botánico de Quito y en el Parque metropolitano Metro Sur ubicado en el sector de El Troje, entre la Av. Simón Bolívar y cantón Rumiñahui.

2.3 Metodología

2.3.1 Escarificación de *Geranium chilloense*

Se evaluaron dos tipos de escarificación. En la primera (E1), se dejaron las semillas de *G. chilloense* en 50 ml de agua destilada estéril durante tres días a temperatura ambiente, luego se sumergieron las semillas en una dilución al 10% de ácido acético por dos horas.

La segunda escarificación (E2) se hicieron variaciones en el tiempo de hidratación, hasta cinco días y luego una inmersión en una dilución al 10% de ácido acético por cuatro horas.

2.3.2 Desinfección e introducción al medio de cultivo

Para la desinfección de las semillas de *G. chilloense* se evaluaron tres protocolos de desinfección, descritos en la Tabla 1.

Posterior a la desinfección se introdujeron las semillas en un medio de cultivo. En esta fase, se evaluó la concentración de sales MS (Murashige & Skoog), T1 completo (MS), T2 a la mitad (MS 1/2) y T3 un cuarto de su concentración (MS 1/4), suplementado con 30 g/L de sacarosa, 4,8 g/L de agar y 150 ml de agua de coco, en ausencia de reguladores de crecimiento.

2.3.3 Multiplicación en explantes de *Geranium chilloense*

Se introdujo un explante por frasco con medio de cultivo MS 1/4. Se evaluó la interacción entre BAP (Bencil amino purina) y AIA (Ácido indol acético) en seis tratamientos, T1: sin reguladores de crecimiento; T2: 0 ppm de BAP + 0,5 ppm de AIA; T3: 0 ppm de BAP + 1 ppm de AIA; T4: 1 ppm de BAP + 0 ppm de AIA; T5: 1 ppm de BAP + 0,5 ppm de AIA; T6: 1 ppm de BAP + 1 ppm de AIA.

Tabla 1. Protocolos evaluados en la fase de desinfección de *Geranium chilloense*.

Protocolos	Alcohol		NaOCl		Tween	L.A.E
	%	T.I.	%	T.I.		
P1	96	10 seg	50	10 min	-	3
P2	-	-	50	15 min	1 gota	3
P3	70	1 min	20	20 min	1 gota	4

T.I.= tiempo de inmersión;
L.A.E= Lavados en agua destilada estéril.

Tabla 2. Resultado de porcentajes de las variables evaluados en la Fase 0 en *Geranium chilloense* a los 60 días.

Trat	% FE	% G	%S
E1	22 a	31a	29a
E2	47 b	26a	27a

FE= Fenolización al explante;
G= Germinación;
S= Sobrevivencia.
Medias con letras distintas presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).

2.3.4 Adaptación al sustrato en *Geranium chilloense*

Para esta etapa, se utilizaron bandejas de germinación de 48 alveolos. Se sembraron los explantes provenientes de la fase de multiplicación. Se valoraron los sustratos fibra de coco (S1) y turba (S2), ambos estériles.

2.3.5 Diseño estadístico

Los experimentos fueron conducidos con un diseño de bloques completamente al azar; para el análisis estadístico de los datos se realizó análisis de varianza de una vía (ADEVA); para las comparaciones de los porcentajes y medias, se aplicó el test de Duncan. Los datos fueron procesados con el paquete estadístico InfoStat/L.

3 Resultados y discusión

Los resultados obtenidos sobre el desarrollo de un protocolo *in vitro* para *Geranium chilloense*, presentados a continuación, representan el primer reporte sobre la especie (Benavides, y Córdova, 2015).

3.1 Escarificación

Se observó que el tratamiento E1 (hidratación tres días + inmersión en ácido acético al 10% dos horas), presentó mayor porcentaje de germinación (31%) y supervivencia (29%) y, baja fenolización del explante (22%) (Tabla 2).

Santamaría, (2012), expone que para la semilla es necesario realizar un proceso de escarificación, puesto que la testa puede tener un alto contenido lipídico, ser muy gruesa o dura lo cual impide la absorción de nutrientes del medio de cultivo *in vitro* evitando su germinación; además, recomienda el tratamiento pre-germinativo de inmersión durante dos días en agua destilada, en embriones maduros de *Cedrela montana*. Lozano, (2011), citado por Black y Derek Bewley, (2006), sugiere realizar una ruptura del tegumento en la semilla e inmersión en agua durante 5 días en *Caesalpinia spinosa*. Pece, Sobrero, Acosta y Rossi, (2014), indican que la inmersión en agua por seis horas, permitió el 82% de germinación en la semilla de *Geoffroea decorticans* en menor número de días (4,6).

Figura 1. Comparación de variables contaminación, fenolización y sobrevivencia con respecto a los protocolos de desinfección en *Geranium chilloense*.

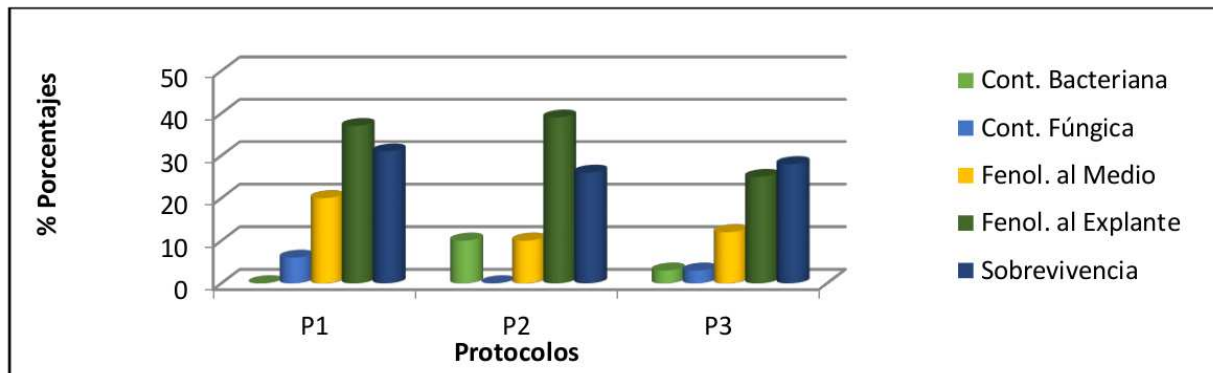
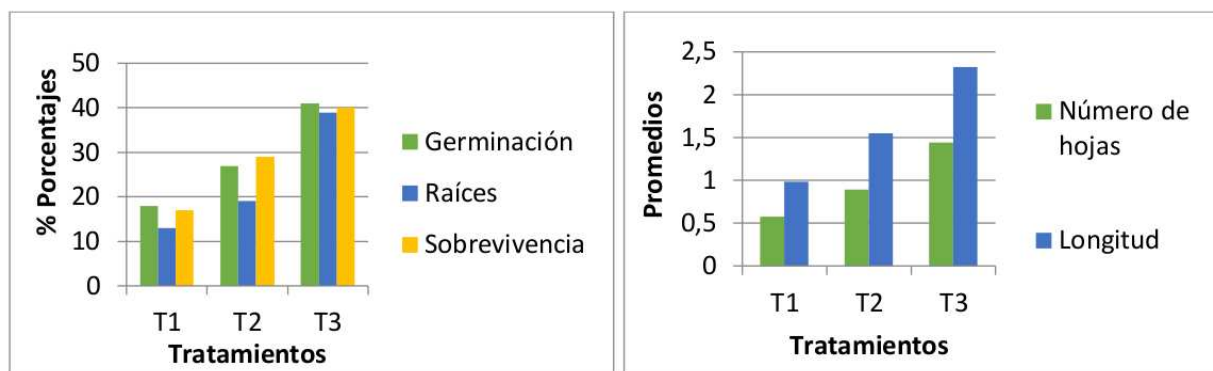


Figura 2. Izquierda: Comparación de porcentajes de germinación, raíces y sobrevivencia. Derecha: Comparación de promedios de número de hojas y longitud, con respecto a la concentración de sales MS en *G. chilloense*. T1: MS, T2: MS 1/2 y T3: MS 1/4.



3.2 Desinfección e introducción al medio de cultivo

3.2.1 Protocolos de desinfección

En la desinfección se observó que el protocolo P1 alcanzó un óptimo resultado en contaminación bacteriana (0%) y mayor porcentaje de sobrevivencia (31%); P2 no obtuvo contaminación fúngica (0%) y presentó una baja fenolización del medio (10%); mientras que, P3 mostró un bajo porcentaje de contaminación fúngica (3%) y bacteriana (3%), baja fenolización del medio (12%) y del explante (25%), y un porcentaje de sobrevivencia del 28% (Figura 1). Se seleccionó al protocolo P3 como óptimo, para

la desinfección de *Geranium chilloense*, debido a que el bajo porcentaje de fenolización y contaminación fúngica, favorece la germinación y desarrollo de los explantes.

El protocolo escogido (P3), concuerda con lo encontrado por Ayala, (2012), que presentó bajos índices de contaminación y altos porcentajes de sobrevivencia en la desinfección de hojas de *Gerbera jamesonii* utilizando hipoclorito de sodio (1%) por 20 minutos. Coba (2009), obtuvo los mejores resultados de desinfección en meristemos de *Fragaria chiloensis*, con una inmersión en alcohol al 70% (1 min) e hipoclorito de sodio al 20% (20 min). Noroña, (2010), recomienda el uso de hipoclorito de sodio (1%) du-

rante 15 minutos, para la desinfección en *Myrciaria dubia*, ya que obtuvo el mayor porcentaje de sobrevivencia y óptimos resultados en la descontaminación bacteriana.

3.2.2 Introducción al medio de cultivo

Para la introducción al medio de cultivo se determinó que tratamiento T3 (MS 1/4) presentó mayores porcentajes de germinación (41%), presencia de raíces (39%) y sobrevivencia (40%), de igual manera altos promedios en número de hojas (1,44) y longitud (2,32 cm); mientras que, T1 presentó menores porcentajes y promedios de las variables evaluadas durante la introducción (Figura 2).

Freire, Carnevale, Alzugaray y Bueno, (2014), reportan una regeneración de brotes de *Schinus fasciculata*, del 100% en MS 1/2 y MS 1/4, además indican se obtuvo una mayor altura del brote (3,35 cm) con MS 1/4. Sansberro y Mroginski, (1995), revelaron óptimos resultados en la regeneración de *Aloysia polystachia*, reduciendo la concentración de sales MS al 25% en ausencia de reguladores de crecimiento; aludiendo que concentraciones mayores de sales (100% y 50%), provocaron altos grados de fenolización y necrosamiento del material vegetal.

Pedroza y Caballero, (2009), estudiaron distintas concentraciones de sales MS (100%, 50% y 25%) en

propágulos de *Marchantia polymorpha*, obteniendo una rápida adaptabilidad al medio, buen desarrollo, rápido crecimiento, buen vigor y alto porcentaje de sobrevivencia al usar una cuarta parte de la concentración sales MS; indicando que, bajas concentraciones de sales minerales provocan un mayor potencial hídrico que favorece el buen desarrollo vegetativo.

Uribe, Delaveau, Garcés y Escobar, (2008), indicaron que el medio MS presenta un contenido alto de nitrógeno (60 meq/L), que puede afectar la sobrevivencia y viabilidad de los explantes; además, los medios ricos en nitrógeno pueden favorecer la necrosis de los tejidos. De esta manera al diluir los medios de cultivo se favorece al desarrollo y vigor de los explantes, obteniendo plántulas más saludables con hojas más verdes y expandidas.

3.3 Multiplicación

Durante la fase de multiplicación, el tratamiento T2 (AIA 0,5 ppm), presentó mayor promedio de número de brotes (3,88), número de hojas (3,88) y longitud (4,98 cm), al igual que un alto porcentaje de sobrevivencia (88%), de entre los seis tratamientos utilizados para la propagación de *Geranium chilloense* (Tabla 3).

Tabla 3. Promedios de las variables evaluadas en la fase de multiplicación en *Geranium chilloense* a los 30 días.

Trat	N.B	N.H	L (cm)	% P.R	% S
T1	2.00 a	2.00 a	4.22 a	78 a	78 a
T2	3.88 a	3.88 a	4.98 a	88 a	88 a
T3	2.88 a	2.38 a	4.00 a	63 a	88 a
T4	3.78 a	3.33 a	4.81 a	56 a	89 a
T5	3.22 a	3.22 a	4.76 a	56 a	78 a
T6	3.38 a	3.00 a	3.16 a	38 a	75 a

N.B=Número de brotes;

N.H=Número de hojas;

L=Longitud;

P.R=Presencia de raíces;

S=Sobrevivencia.

T1: sin reguladores de crecimiento;

T2: 0 ppm de BAP + 0,5 ppm de AIA;

T3: 0 ppm de BAP + 1 ppm de AIA;

T4: 1 ppm de BAP + 0 ppm de AIA;

T5: 1 ppm de BAP + 0,5 ppm de AIA;

T6: 1 ppm de BAP + 1 ppm de AIA.

Medias con letras distintas presentan diferencias significativas (p<0.05)

Tabla 4. Porcentajes y promedios de las variables evaluadas en la fase de adaptación al sustrato en *G. chilloense* a los 30 días.

Trat.	% P	% S	N.H	L (cm)	C
S1	62 a	67 a	2,95a	4,74 a	2,86 a
S2	81 a	81 a	4,76 b	5,85 a	3,57 a

P=Prendimiento;
 S=Sobrevivencia;
 N.H=Número de hojas;
 L=Longitud;
 C=Color.
 Medias con letras distintas presentan diferencias significativas
 (p<0.05).

Pedroza, (2009), afirma que las auxinas o cualquier otro tipo de regulador de crecimiento, son fisiológicamente funcionales cuando se encuentran en pequeñas cantidades, y que una alta concentración de estas sustancias ejerce un efecto negativo sobre las plantas; lo que concuerda con los resultados obtenidos.

Los resultados concuerdan con Lozada, (2010), quien en la multiplicación *in vitro* de *Solanum batataea* evaluó tres reguladores de crecimiento (AIA, BAP y BRA), de manera individual y su interacción en conjunto; encontró que AIA (0,5 ppm) presentó una alta generación de brotes (12,49) y el mayor promedio de altura (52,17 mm); sin embargo, recalca que la interacción entre BAP:AIA proporcionó mejores resultados en número de brotes (17,57). Pacheco y Pedroza, (2014), indican que la adición de AIA (0,5 ppm) y Kinetina (1,5 ppm) favoreció a la regeneración de brotes en *Pasiflora popenovii*.

3.4 Adaptación al sustrato

El sustrato óptimo para la adaptación de sustrato en *Geranium chilloense*, fue la turba (S2), al presentar mayores porcentajes de prendimiento (81%) y sobrevivencia (81%), al igual que mejores promedios en número de hojas (4,76) y longitud (5,85 cm), en relación a la fibra de coco (S1) (Tabla 4).

González, (2013), evaluó dos mezclas de sustratos (arena: turba y perlita: vermiculita), para la preaclimatación y aclimatación en el invernadero en plántulas de *Rosa canina*, obteniendo mayor tasa de sobrevivencia con la combinación turba: arena, en el proceso de pre-aclimatación con el 51% y alcanzó el 95% de sobrevivencia en aclimatación.

Ginderdeuren, (2009), estudió las variables número de hojas, número de raíces, altura y sobrevi-

vencia en plántulas de *Chlorea virescens*, mediante la evaluación de tres mezclas de sustratos: turba + perlita (1:1), turba+ arena (1:1) y *Sphagnum*, para la fase de aclimatación; evidenciando que, el sustrato adecuado fue turba + perlita, ya que presentó los mejores resultados en las variables mencionadas previamente. Además, explica que la turba tiene mayor cantidad de nitrógeno, fósforo, calcio, magnesio y azufre disponible en relación a otros sustratos, por lo que es un sustrato favorable para la fase de aclimatación ya sea solo o en combinación con otros sustratos.

4 Conclusiones

Para el cultivo *in vitro* de *Geranium chilloense* se sugiere aplicar una escarificación basada en hidratación 3 días y sumersión en ácido acético al 10% durante 2 horas. Para la desinfección de las semillas, se recomienda aplicar los tratamientos P1 y P3, con adición de alcohol en el proceso.

Para obtener una mejor adaptación al medio de cultivo se plantea utilizar el tratamiento T3, con sales de MS reducidas al 25% ya que permitió obtener 41% de semillas germinadas. Para la fase de multiplicación se propone usar medio MS 1/4 adicionado con 0,5 ppm de AIA, que permitió obtener mayor número de brotes (3,88), número de hojas (3,88) y longitud (4,98 cm). En la fase de adaptación al sustrato, se recomienda adaptar las vitroplantas con turba estéril, sustrato que alcanzó el 81% de sobrevivencia en las plantas.

5 Agradecimientos

Se agradece al Jardín Botánico de Quito en especial al Departamento técnico: Ing. Tatiana Jaramillo, Ing. Felipe Andrade e Ing. Alicia Morales por su apoyo y conocimiento aportado a la presente investigación.

Bibliografía

- Aedo, C. 2012. Systematic Botany Monographs Revision of *Geranium* (*Geraneaceae*) in the New World.
- Ayala, J. 2012. Evaluación de un protocolo de desinfección y de cuatro reguladores de crecimiento en el medio Murashige Skoog (1962), para la generación in vitro de callo a partir de hoja de gerbera (*Gerbera jamesonii*). Guatemala.
- Benavides, T. y A. Córdova. 2015. Desarrollo de un protocolo de propagación in vitro de *Geranium chilloense* Willd. ex Kunth. y *Lupinus pubescens* Benth. para la obtención de plantas completas, para la primera etapa de restauración de las quebradas de Quito. Quito, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana.
- Black, M. y J. Derek Bewley. 2006. The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and uses. Wallingford, United Kingdom.: Eds. M. Black, J. Derek Bewley and P. Halmer. CAB International.
- Coba, M. 2009. Rescate (*Fragaria chiloensis*) var. Huachi especie de frutilla en especie de extinción, a través de la técnica cultivo in vitro utilizando meristemas y hojas.
- El Comercio. 2009. comercio.com. 25 plantas nativas se estudian en Quito: <http://www.elcomercio.com/actualidad/25-plantas-nativas-estudian-quito.html>. 16 de Julio de 2009.
- Freire, R., N. J. Carnevale, C. Alzugaray y M. S. Bueno. 2014. Cultivo in vitro de *Schinus fasciculata* (Griseb) J.M. Johnston var. fasciculata (molle). **Scielo**.
- Ginderdeuren, V. 2009. Aclimatación de plántulas de *Chlorea virescens* (Wild). Lindi. cultivadas in vitro. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile- Escuela de Agronomía.
- González, P. 2013. Enraizamiento in vitro y ex vitro y aclimatación de *Rosa canina* L. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile- Facultad de Ciencias Agrarias- Escuela de Agronomía.
- Jaramillo, T. 2013. Plantas Nativas de la Hoya de Quito. Quito: Fundación Botánica de los Andes.
- Lozada, P. 2010. Evaluación del efecto de auxinas, citoquininas y brasioesteriodes sobre las fases de establecimiento y multiplicación del cultivo in vitro del tomate de árbol (*Solanum batataeae*). Sangolquí: Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE.
- Lozano, Z. 2011. Establecimiento de un protocolo para la propagación in vitro de guarango *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, a partir de plántulas como herramienta para la preservación de esta especie. Sangolquí: ESPE.
- Noroña, A. 2010. Determinación de un método de desinfección y un medio de cultivo in vitro de camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K Mc Vaugh) Cutuglagua Pichincha. Quito.
- Pacheco, R. y J. Pedroza. 2014. Evaluación de la micropropagación por cultivo de tejidos vegetales in vitro en dos especies de passifloras (*Passiflora popenovii* Killip y *Passiflora edulis* Sims). Universidad Distrital Francisco José de Caldas.
- Pece, M. G., M. T. Sobrero, M. Acosta y F. Rossi. 2014. Tratamientos pregerminativos en *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart var. decorticans Foresta Veracruzana. <http://www.redalyc.org/>. páginas 31-36.
- Pedroza, J. y M. Caballero. 2009. Evaluación del efecto del medio MS y la temperatura en el desarrollo de propágulos de *Marchantia polymorpha* L. (Marchantiaceae) bajo condiciones in vitro y ex vitro. **Revista Colombiana de Biotecnología**. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/11713/37209>.
- Ruales, C. y J. Guevara. 2010. La flora patrimonial de Quito descubierta por la expedición de Humboldt y Bonpland en el año 1802. **Avances en Ciencias e Ingenierías**. B54-B55.

Sansberro, P. y L. Mroginski. 1995. Micropropagación de *Aloysia polystachia* (Verbenaceae). **Agriscientia**. páginas 83-86.

Santamaria, A. 2012. Establecimiento de un protocolo para la germinación *in vitro* e inducción a callo embriogénico de cedro (*Cedrela montana*) a partir de embriones zigóticos. Sangolquí:

ESPE.

Uribe, M., C. Delaveau, M. Garcés, R. Escobar. 2008. Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. Bosque (Valdivia).