

Multiplicación *in vitro* de *Gmelina arborea* Roxb en Sistemas de Inmersión Temporal

Andrea Hernández Aguilar^{1*}, Alejandra Rojas Vargas¹, Ana Hine¹, Marcos Daquinta². *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Investigaciones y Servicios Forestales (INISEFOR), Universidad Nacional. Santa Lucía de Barva, Heredia, Costa Rica. e-mail: ahernandez.ag@gmail.com

²Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón km 9. Ciego de Ávila. CP 69450. Cuba.

RESUMEN

Gmelina arborea Roxb. es una de las especies que más se emplea en proyectos de reforestación. Comúnmente se propaga por semillas y estacas. También se ha micropropagado en medio de cultivo semisólido. El empleo de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) podría contribuir a elevar los coeficientes de multiplicación. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de multiplicar *in vitro* *G. arborea* en SIT. Se emplearon cinco explantes por SIT con 100 ml de medio de cultivo. Las inmersiones se realizaron una vez por día por un período de un minuto y el ciclo completo constó de 30 días. Como control se estableció el mismo número de explantes en un medio de cultivo semi-sólido con frascos similares a los del SIT. Los resultados indicaron un incremento en el coeficiente de multiplicación (5.01), una mayor longitud (1.49 cm) y vigor de los brotes cultivados en SIT en comparación con el control. Se demostró la utilidad del empleo de SIT en el cultivo *in vitro* de esta especie forestal.

Palabras clave: automatización, cultivo *in vitro* forestales, coeficiente de multiplicación.

In vitro multiplication of *Gmelina arborea* Roxb in Temporary Immersion Systems

ABSTRACT

Gmelina arborea Roxb. it is one of the most widely used species in reforestation projects. It is commonly propagated by seeds and cuttings. Besides, it has been micropropagated in semisolid culture medium. The use of Temporary Immersion Systems (TIS) could help to increase multiplication coefficients. The aim of this paper was to *in vitro* multiply of *G. arborea* in TIS. Five explants per 100 ml of culture medium and one immersion per day for a period of one minute were used in each TIS. The complete cycle consisted of 30 days. As a control, the same numbers of explants were established in a semi-solid culture medium with similar bottles of TIS. Results indicated an increase in the multiplication coefficient (5.01), a greater length (1.49 cm) and vigor in sprouts grown in TIS compared with control. It was demonstrated the utility of TIS for the *in vitro* culture of this tree species.

Keywords: automation, *in vitro* culture forest species, multiplication coefficient.

INTRODUCCIÓN

Las plantaciones forestales, son bosques constituidos por árboles de una misma especie o de especies diferentes que han sido sembrados por el ser humano. Su importancia radica en que son una fuente importante para la obtención de la madera y son aliadas en el resguardo del medio ambiente, ya que promueven la protección de ecosistemas tanto para flora como fauna. Además, son una

alternativa para disminuir el porcentaje de CO₂ en la atmósfera (Alice *et al.*, 2004). También, las plantaciones forestales contribuyen en los ingresos económicos de Costa Rica como producto del pago de servicios ambientales (PAS) (Louman, 2005; Fonseca *et al.*, 2012).

Gmelina arborea Roxb. es una especie de árbol maderable que pertenece a la familia Lamiaceae, nativo de la India y de gran parte del sudeste de Asia. Los rodales naturales de

G. arborea Roxb. se encuentran entre 5° y 30° N entre 50-1300 m de altitud en los bosques semi-decíduos en las regiones tropicales y subtropicales de Bangladesh, Camboya, China, la India, Laos, Myanmar, Nepal, (oeste), Pakistán, Sri Lanka, Tailandia y Vietnam (Indira, 2006; Naik *et al.*, 2009; Solano, 2010; Wee *et al.*, 2012).

Además, es ampliamente utilizada en el establecimiento de plantaciones en las áreas tropicales de todo el mundo, por lo que se considera una especie de alto valor económico. Esta especie se caracteriza por ser una planta de rápido crecimiento, puede llegar a medir 30 m de alto y 80 cm de diámetro, sus hojas son grandes y sus flores presentan una coloración amarillo-anaranjada (Indira, 2006; Naik *et al.*, 2009; Solano, 2010; Wee *et al.*, 2012).

Su importancia radica en que es una de las especies forestales más utilizadas en proyectos de reforestación debido a que presenta un buen desarrollo silvicultural (Moya, 2004; de Kok, 2012). Además, se reconoce que su madera es de buena calidad y es ampliamente empleada el mercado de la construcción, ebanistería, paneles de madera y como fuente de pulpa para papel (Indira, 2006; Naik *et al.*, 2009; Wee *et al.*, 2012). Asimismo, el establecimiento de plantaciones ha permitido disminuir las importaciones de madera, lo que representa una disminución significativa en los costos de producción y por ende un beneficio económico para Costa Rica (González *et al.*, 2004).

En Costa Rica, existen aproximadamente 164 000 ha dedicadas a la plantación de especies forestales, de las cuales aproximadamente 65 000 ha son de esta especie. Por ello, se considera una de las más importantes para la reforestación y para el establecimiento de plantaciones (Muñoz y Moya, 2008; Solano, 2010).

G. arborea, es una especie que comúnmente se propaga mediante semillas y esquejes. La reproducción mediante semillas trae consigo una mayor variabilidad genética entre los individuos y la reproducción asexual mediante esquejes beneficia la producción masiva de individuos de un mismo genotipo. No obstante,

los individuos propagados por las técnicas antes mencionadas presentan un crecimiento lento (Álvarez *et al.*, 2011).

A partir de 1996, compañías como la Ston Forestal S.A (Costa Rica) comenzaron a producir semillas obtenidas de cruces controlados de los mejores árboles de su programa de mejoramiento genético para ser evaluados en campo como posibles clones. Para realizar las pruebas de campo, la empresa requirió de 2 a 3 años para obtener un número apropiado de copias de estacas enraizadas, a partir de las plántulas obtenidas de las semillas producidas de los cruces controlados. Lo anterior, despertó el interés por implementar las técnicas de cultivo *in vitro* para la propagación de plántulas a partir de semillas.

En este sentido, Valverde *et al.* (2004), lograron el establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de plántulas de *G. arborea* a partir de semillas obtenidas de cruces controlados. Para la multiplicación, emplearon segmentos nodales cultivados en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP). Los brotes obtenidos fueron subcultivados en el mismo medio de cultivo con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB) y transferidos a turba (sustrato a base de *Sphagnum* sp.) para su enraizamiento.

Por otra parte, Yepes (2006), estableció el 51% de yemas procedentes de brotes de material vegetal adulto revigorizado de *G. arborea*, en un medio de cultivo de Schenk y Hildebrandt (Schenk y Hildebrandt, 1972) y Nakamura (2006) logró establecer brotes apicales de *G. arborea* en un medio de cultivo B5 semi-sólido a la mitad de sus sales. No obstante estos avances, los coeficientes de multiplicación han sido bajos.

En los últimos años, como parte de las técnicas de cultivo *in vitro*, se ha implementado el uso de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) en el cultivo de especies como *Anthurium andraeanum* Lind. (del Rivero-Bautista *et al.*, 2004), orquídeas del género *Phalaenopsis* (Pisowotzki *et al.*, 2008), *Zantedeschia* sp. (Sánchez *et al.*, 2009), así como también en especies de importancia comercial como el café

(*Coffea* spp.) (Ducos *et al.*, 2007) y el cacao (*Theobroma cacao* L.) (Niemenak *et al.*, 2007), entre otras. Asimismo, ha sido empleada en algunas especies leñosas, como *Tectona grandis* L. (Quiala *et al.*, 2012) y *Rubus* sp. (Arenciba *et al.*, 2013), en las cuales se observaron altos coeficientes de multiplicación en los SIT en comparación con los resultados en medio de cultivo semisólido.

Sin embargo, hasta el momento no se han publicado resultados en cuanto a la utilización de los SIT en el cultivo de *G. arborea*, que de tener un efecto positivo, permitiría aumentar los coeficientes de multiplicación y a su vez disminuir los costos de producción con mayores beneficios económicos para el país. El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de multiplicar *G. arborea* en Sistema de Inmersión Temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Investigación y Servicios Forestales de la Universidad Nacional (INISEFOR), Costa Rica.

Material vegetal

Se utilizaron plantas obtenidas *in vitro* de la familia 8_{10} establecidas por Valverde *et al.* (2004). El explante utilizado consistió de un segmento nodal de una planta *in vitro*, que se encontraba en fase de multiplicación (fase II), con dos subcultivos y en un medio de cultivo MS con 3% (m/v) de sacarosa, 0.7% (m/v) de agar y pH ajustado a 5.8.

Posteriormente, se extrajeron los meristemos (0.5 mm) de yemas axilares del segmento nodal. En total se extrajeron 130 meristemos, los cuales se cultivaron en medio de cultivo semisólido, compuesto por las sales MS al 100%, 0.1 mg l⁻¹ de tiamina, 0.5 mg l⁻¹ de ácido nicotínico, 0.5 mg l⁻¹ de piridoxina, 2 mg l⁻¹ de glicina, 100 mg l⁻¹ de inositol, 3% (m/v) de sacarosa, 2.8 g l⁻¹ de Phytigel™, y se le adicionaron 0.288 g l⁻¹ de peptona y 0.065 g l⁻¹ de extracto de levadura. El pH fue ajustado a 5.7-5.8. Posteriormente, se esterilizó en autoclave, durante 20 minutos a 121°C y una presión de 1.1 kg/cm². Lo anterior, se realizó con el objetivo de detectar microorganismos contaminantes, ya que las plantas

establecidas *in vitro* presentaron síntomas de contaminación microbiana.

El cultivo se colocó en el cuarto de crecimiento con una intensidad lumínica de 24.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ generados por tubos fluorescentes de luz blanca, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 h oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Transcurridos 8 días de cultivo se evaluó la presencia o ausencia de contaminación microbiana en el explante. Posteriormente, los explantes libres de contaminación microbiana visible se transfirieron al medio de cultivo semisólido MS para su elongación.

Multiplicación de *Gmelina arborea* Roxb. en Sistema de Inmersión Temporal

El sistema de inmersión consistió en dos frascos de vidrio de 740 ml con filtros hidrofóbicos de 0.2 μm para garantizar la esterilidad del aire que ingresaba al sistema, cada uno con tapa de rosca y mangueras de silicona que interconectaban los frascos, en total se utilizaron cuatro de estos sistemas (Escalona *et al.*, 1999).

Los explantes utilizados fueron segmentos nodales sin hojas con una longitud de entre 0.5 y 1 cm. Cada tratamiento consistió de 20 explantes que se distribuyeron al azar en los cuatro frascos. Se empleó una densidad de inoculación de cinco explantes por frasco de cultivo y 100 ml de medio de cultivo. Este contenía las sales MS al 100% y 1 mg l⁻¹ de BAP.

El control de la presión de aire y el tiempo de inmersión del sistema fue de manera completamente automatizada. Las inmersiones se realizaron una vez por día por un período de un minuto y el ciclo completo constó de 30 días. Como control del ensayo se estableció un cultivo con frascos idénticos a los del SIT y con la misma densidad de inoculación y medio de cultivo, al cual se le adicionaron 2.8 g l⁻¹ de Phytigel™.

En el caso del tratamiento control, los frascos se sellaron con tapa de plástico adhesivo y bandas de hule mientras que los del SIT se sellaron con tapa rosca y papel adhesivo para garantizar la esterilidad del sistema y evitar fugas de aire.

Los cultivos se colocaron en el cuarto de crecimiento con una intensidad lumínica de $24.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ generados por tubos fluorescentes de luz blanca, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 h oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

A los 30 días de cultivo se extrajeron los explantes en la cámara de flujo laminar y se cuantificó el número brotes obtenidos y el número de hojas por explante. Además, se midió la longitud de los brotes (cm). Dichas variables fueron evaluadas tanto para el SIT como para el tratamiento control en el medio de cultivo semisólido.

El coeficiente de multiplicación se calculó como el cociente del número final de brotes producidos por cada segmento nodal entre el número inicial de brotes.

Para el análisis de datos se utilizó el programa Statgraphics centurion XVI.I y para determinar las diferencias entre las medias de los datos se utilizó la prueba de t-Student para el coeficiente de multiplicación y la prueba de Wilcoxon para el número de brotes, número de hojas y longitud de los

brotes debido a que estos datos no presentaban normalidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Multiplicación de *Gmelina arborea* Roxb. en Sistema de Inmersión Temporal

Se comprobó que con el Sistema de Inmersión Temporal se duplicó el número de brotes obtenidos con respecto al cultivo en medio de cultivo semisólido (Tabla 1), lo que a su vez produjo un coeficiente de multiplicación mayor. Dichos brotes presentaron mayor longitud y vigor en comparación con los cultivados en medio de cultivo semisólido (Figura 1).

La diferencia significativa entre los coeficientes de multiplicación en el SIT y en el medio de cultivo semisólido, podría deberse a que según De Fera *et al.* (2003) la agitación que se produce en el momento en que se realiza la inmersión disminuye la dominancia apical y a su vez puede provocar la separación de los explantes, lo que conlleva a que se vea favorecida la producción de brotes y por ende se dé un aumento significativo en el coeficiente de multiplicación (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto del Sistema de Inmersión Temporal (SIT) en la multiplicación y crecimiento *in vitro* de *Gmelina arborea* Roxb.

Tratamiento	Número de brotes	Número de hojas	Longitud de los brotes (cm)	Coeficiente de multiplicación
SIT	5.0 ± 2.67 a	5.06 ± 2.49 b	1.49 ± 1.11 a	5.1 ± 1.60 a
Control*	2.35 ± 1.13 b	6.34 ± 2.54 a	0.90 ± 0.43 b	2.3 ± 0.57 b

*Medio de cultivo semisólido. Valores de medias con letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas para $p < 0.05$ de acuerdo con la pruebas de Wilcoxon y T-Student.

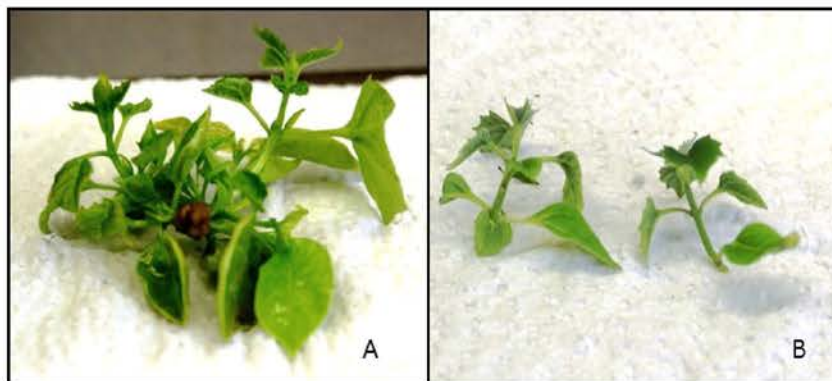


Figura 1. Explantes de *Gmelina arborea* Roxb cultivados en SIT (A) y en medio de cultivo semisólido (B) por un período de 30 días.

Este efecto positivo que se obtuvo en la multiplicación de *G. arborea* Robx., coincide con lo referido por otros autores que han indicado que en la micropropagación de especies, las condiciones de cultivo tradicionales tienen una serie de desventajas en cuanto al ambiente y la nutrición de las plantas. Entre estas se puede mencionar una alta temperatura, una humedad relativa constante y cambios en el porcentaje de CO₂ durante el fotoperíodo, así como también una alta concentración de sacarosa, reguladores de crecimiento, desechos metabólicos de las plantas y sales en el medio de cultivo. Además, la tasa de crecimiento puede ser baja y existe una pobre difusión de oxígeno que afecta la calidad de plantas producidas (George *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2012). Por lo anterior, los resultados en el tratamiento control sugieren que estos factores podrían haber afectado el crecimiento de las plantas a través de alteraciones en su anatomía y fisiología.

Estas desventajas se disminuyen con el empleo del SIT en el cultivo *in vitro*. El SIT es una alternativa que mejora las condiciones de crecimiento de las plantas, ya que permite una renovación constante de la atmósfera dentro de los recipientes, lo que evita la acumulación de gases tóxicos, mejora el porcentaje de enraizamiento y supervivencia de las plantas en la fase de aclimatización y aumenta los niveles de automatización de algunas etapas de la micropropagación. Además, se favorece una mayor superficie de contacto entre el explante y el medio de cultivo pero por un tiempo más corto, lo que permite a las plantas satisfacer sus demandas nutricionales y mejorar su calidad. Al mismo tiempo posibilitan que los brotes generados tengan comportamientos fisiológicos similares a los que presentan las plantas en condiciones *ex vitro* (Etienne y Berthouly, 2002; Sánchez *et al.*, 2009; Fundación para la Innovación Agraria, 2010; Lezcano *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2012; Quiala *et al.*, 2012). En consecuencia, los SIT favorecen la obtención de un número mayor de plantas vigorosas y sanas, en menor tiempo. Específicamente, en el caso de *G. arborea* Robx. se obtuvieron mejores resultados que los informados por Valverde *et al.* (2004) y Nakamura (2006) en un medio de cultivo semisólido con 1 mg l⁻¹ de BAP.

Por otra parte, en cuanto al número de hojas de los brotes, los valores en medio de cultivo semisólido fueron superiores al cultivo en SIT

(Tabla 1). Sin embargo, no afectó la calidad de los brotes y su longitud fue superior con Inmersión temporal (1.45 cm) (Tabla 1).

En las hojas más jóvenes de los explantes cultivados en SIT, se presentaron síntomas de hiperhidricidad (datos no mostrados). Este es un que fenómeno se presenta en plantas cultivadas en SIT (González *et al.*, 2011). Esta condición se atribuye a un desorden fisiológico que está directamente relacionado con un exceso de absorción de agua del medio de cultivo, el cual se presenta en condiciones de alta humedad y poca intensidad lumínica, entre otras variables (Tasca *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2011).

También, según González *et al.* (2011) los síntomas de hiperhidricidad se podrían deber a la formación de una película acuosa sobre la superficie de los tejidos cultivados en SIT, la cual podría interferir en el intercambio gaseoso en la superficie de la hoja. Lo anterior, se debe a que las tasas de difusión de un gas en el aire son mayores, en comparación con la tasa de difusión en un líquido. Sin embargo, y de acuerdo con Etienne y Berthouly (2002) este fenómeno podría ser eliminado al controlar y ajustar el tiempo de inmersión en el sistema.

Para el caso de *G. arborea* Robx., cabe resaltar que el problema fue resuelto al transferir estos explantes del SIT al medio de cultivo semisólido para su elongación, donde se recuperaron rápidamente lo que indicó que el daño provocado no afectó en gran medida la fisiología de las plantas.

CONCLUSIONES

Por primera vez se logró la multiplicación de *Gmelina arborea* Roxb. mediante Sistema de Inmersión Temporal lo cual tuvo un efecto positivo en el cultivo de esta especie ya que se alcanzó un mayor coeficiente de multiplicación, longitud y vigor de los brotes en comparación con los obtenidos mediante el método de cultivo *in vitro* tradicional en medio de cultivo semisólido.

REFERENCIAS

Alice, F, Montagnini F, Montero M (2004) Productividad en plantaciones puras y mixtas de especies forestales nativas en la Estación Biológica La Selva, Sarapiquí, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 28(2): 61-71

- Álvarez, J, Beltrán P, Diana M, Mesa L (2011) Evaluación de reguladores de crecimiento vegetal en la organogénesis de *Gmelina arborea* Roxb. Tumbaga 6: 107-124
- Castro, JI, Agramonte D, Alvarado-Capó Y, De Fera M, Pugh T (2012) Empleo de métodos biotecnológicos en la producción de semilla de papa. Biotecnología vegetal 12(1): 3-24
- Arenciba, DA, Vergara C, Quiroz K, Carrasco B, García R (2013) Establishment of photomixotrophic cultures for raspberry micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). Scientia Horticulturae 160: 49-53
- De Fera, M, Chávez M, Quiala E, Jiménez E (2003) Efecto de la densidad de inóculo y la frecuencia de inmersión en la propagación *in vitro* de *Psidium guajava* cv. Enana roja en Sistemas de Inmersión Temporal. Biotecnología Vegetal 3(3): 149-154
- de Kok, R (2012) A revision of the genus *Gmelina* (Lamiaceae). Kew bulletin 67: 293 -329
- del Rivero-Bautista, N, Quiala E, Agramonte D, Barbón R, Camacho W, Morejón L, Pérez M (2004) Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la multiplicación *in vitro* de brotes de *Anthurium andraeanum* Lind. var. Lambada. Biotecnología Vegetal 4(2): 97-100
- Ducos, JP, Labbe G, Lambot C, Petiard V (2007) Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant* 43(6): 652-659
- Escalona, M, Lorenzo J, González B, Daquinta M, González J, Desjardin Y, Borroto C (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Reports 18: 743-748
- Etienne, H, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture 69:215-231
- Fonseca, W, Navarro G, Alice F, Rey-Benayas JM (2012) Impacto económico de los pagos por carbono y servicios ambientales en las inversiones forestales en la región Caribe de Costa Rica. Ecosistemas 21(1-2): 21-35
- Fundación para la Innovación Agraria. Ministerio de Agricultura, CL (2009) Resultados y Lecciones Aprendidas en Sistemas de Inmersión Temporal
- George, E, Hall M, Jan De Klerk, G (2008) Effects of the Physical Environment. En: George E, Hall M, Jan De Klerk, G (Eds) Plant Propagation by Tissue Culture, pp. 423-464. Springer, Wageningen
- González, G, Moya R, Monge F, Cordoba JC (2004) Evaluating the strength of finger-jointed lumber of *Gmelina arborea* in Costa Rica. New Forest 28: 319-323
- González, R, Ríos D, Avilés F, Sánchez-Olate M (2011) Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus globulus* mediante Sistema de Inmersión Temporal. Bosque 32(2):147-154
- Indira, EP (2006) Provenance variations in *Gmelina arborea* with particular reference to tree form. Journal of Tropical Forest Science 18(1): 36-50
- Lezcano, Y, Escalona M, Daquinta M (2010) Multiplicación *in vitro* de *Paeonias* sp. variedad 'SeSu' en Sistemas de Inmersión Temporal. Biotecnología Vegetal 10(3): 169-175
- Louman, B (2005) Efectos del pago por servicios ambientales y la certificación forestal en el desempeño ambiental y socioeconómico del manejo de bosques naturales en Costa Rica. Catie. Turrialba
- Moya, R (2004) *Gmelina arborea* en Costa Rica. Bois et forêts des tropiques 279(1): 47-57
- Murashige, T, Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497
- Naik, D, Singh D, Vartak V, Paranjpe S, Bhargava S (2009) Assessment of morphological and genetic diversity in *Gmelina arborea* Roxb. New Forests 38(1): 99-115
- Nakamura, K (2006) Micropropagation of *Shorea roxburghii* and *Gmelina arborea* by Shoot-Apex Culture. EN: Suzuki K, Ishii K, Sakurai S, Sasaki S (Eds) Plant Technology in Tropical Forest Science. pp137-1504. Springer, Tokyo
- Niemenak, N, Saare-Surminski K, Rohsius C, Omokolo D, Lieberei R (2007) Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. Plant Cell Reports 27(4): 667- 676
- Pisowotzki, C, Saare-Surminski K, Lieberei R (2008) Micropropagation of *Phalaenopsis*-hybrids in Temporary Immersion System (TIS) - Effects of exudated phenolic substances on plant development. Propagation of Ornamental Plants 8 (4): 221-223

- Quiala, E, Cañal MJ, Meijón M, Rodríguez R, Chávez M, Valledor L, De Fera M, Barbón R (2012) Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 109: 223-234
- Sánchez, J, Daquinta M, Capote I, Teixeira da Silva J, Chadwick B (2009) Frequency of Immersion and Paclobutrazol Application Affect the Propagation of *Zantedeschia* sp. var 'Treasure' Shoots in a Temporary Immersion System. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 3 (1): 46-48
- Shenk R A, Hildebrandt (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204
- Solano, GP (2010) Caracterización molecular de clones de *Gmelina arborea* mediante el uso de marcadores moleculares AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Tesis Magister en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá, Colombia
- Tascan, A, Adelberg JW, Joshee N, Yadav A, Tascan M (2007) Liquid culture system for *Scutellaria* species. *Acta Horticulturae* 756: 163-170
- Wee, AKS, Li CH, Dvorak WS, Hong Y (2012) Genetic diversity in natural populations of *Gmelina arborea*: implications for breeding and conservation. *New Forests* 3: 411-428
- Yepes, A (2006) Revigorización y establecimiento *in-vitro* de *Gmelina arborea* Roxb. mediante cultivo de tejidos vegetales. *Colombia Foresta* 9 (19):70-87
- Valverde, L, Alvarado L, Hine A (2004) Micropropagation of clones from controlled crosses of *Gmelina arborea* in Costa Rica. *New forest* 28: 187-194

Recibido: 22-5-2013
Aceptado: 21-6-2013