

MICROPROPAGACION DE MELINA (*Gmelina arborea* ROXB)^{1/*}

José Pablo Gamboa**, Ana Abdelnour^{2/**}

RESUMEN

La melina (*Gmelina arborea*) es una especie forestal exótica de gran interés económico para Costa Rica, debido a su rápido crecimiento y gran variedad de usos. Como parte del programa de mejoramiento genético de melina se está utilizando la polinización cruzada entre árboles elite; sin embargo, el bajo porcentaje de semillas obtenido ha impedido el establecimiento de los respectivos ensayos de progenie. Por lo anterior, se buscó validar un protocolo de micropropagación que permitiera aumentar los volúmenes del material a evaluar. Para establecer el material *in vitro* e inducir la germinación, fue necesario extraer las semillas de endocarpos desinfectados superficialmente e inocularlas en el medio de cultivo. Se encontró que el mejor tratamiento de escarificación fue sumergir los endocarpos en ácido sulfúrico concentrado (96%) por 10 min y luego dejarlos inmersos en agua destilada y autoclavada por 48 h. Durante la etapa de multiplicación se evaluó la respuesta morfogénica del material a la concentración de BAP y de sales inorgánicas en el medio de cultivo. Los mejores resultados se obtuvieron cuando los nudos de las plántulas germinadas *in vitro* se inocularon en el medio de cultivo MS, con la concentración de sales completa y suplementado con 0.5 mg/L de BAP. Se evaluó la respuesta inicial del material al enraizamiento *in vitro*. Ensayos preliminares mostraron la factibilidad de aclimatar bajo condiciones de invernadero las plántulas de melina enraizadas *in vitro*.

ABSTRACT

Micropropagation of melina (*Gmelina arborea* Roxb). Melina (*Gmelina arborea*) is an exotic forest species with high economic potential in Costa Rica, due to its rapid growth and broad variety of uses. Cross pollination between elite trees has been used in breeding programs; however, the low percentage of seed obtained has not allowed the establishment of progenie trials. In view of that, a micropropagation protocol was sought to rapidly increase the promising materials. To establish the material under *in vitro* conditions and to induce seed germination, it was necessary to isolate seeds from previously surface desinfected endocarps. Immersion in 96% sulfuric acid for 10 min, followed by immersion in distilled and autoclaved water for 48 h was the best scarification method. During the multiplication phase, the effect of BAP and inorganic salts concentration in the culture media was evaluated. Cultivation of nodes of *in vitro* germinated plantlets on MS medium with full salt concentration and 0.5 mg/L BAP gave the best results. The inicial response of the material to *in vitro* rooting was also evaluated. Preliminary experiments showed the feasibility to acclimate under greenhouse conditions the melina plants rooted *in vitro*.

1/ Recibido para publicación el 1 de agosto de 1998.

2/ Autora para correspondencia.

* Práctica de Especialidad.

** Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.

** Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.

INTRODUCCION

En el país existe un gran potencial para la reforestación, sin embargo, se recomienda que el cultivo se realice con maderas de alta calidad y productividad. En paquetes tecnológicos de pequeñas y medianas unidades de reforestación y que se incorporen las técnicas de reforestación clonal, a través de programas avanzados de mejoramiento genético y biotecnología. Todo esto complementado con técnicas avanzadas de establecimiento y manejo de plantaciones bajo los estándares internacionales de control de calidad (Murillo 1992).

Un estudio realizado en Costa Rica demostró que más del 50% de las trozas de melina (*Gmelina arborea*) producidas en plantaciones de pequeña y mediana escala, son de regular a mala calidad. De acuerdo con Torres y colaboradores (1995), esta situación se debe entre otras causas, a que la semilla utilizada en los proyectos de reforestación es de mala y dudosa calidad, aún cuando se conoce su procedencia. Ante situaciones como ésta, surgen las técnicas de mejoramiento genético forestal que buscan maximizar la productividad, reducir los costos, establecer plantaciones de calidad y ofrecer así diferentes bienes y servicios (Mesén 1996).

Para la melina ya han sido establecidos programas de mejoramiento genético y se están dando los primeros pasos en la silvicultura clonal, al utilizar material proveniente de jardines de multiplicación. Otra técnica de mejoramiento con gran potencial es la polinización cruzada, entre árboles elite, con el fin de obtener una progenie de individuos superiores. Esta técnica se aplica en huertos semilleros comprobados, pero el esfuerzo económico que se realiza para implementarla es muy alto. Bolstad y Bawa (1982), indicaron que con polinización cruzada se puede lograr hasta un 58% de producción de frutos y semillas. Sin embargo, otros estudios que se están realizando en Costa Rica, son menos promisorios y el porcentaje de éxito en la producción de frutas es de apenas un 33%, imposibilitando el establecimiento de ensayos de progenie para la comprobación genética de los híbridos resultantes. Ya que para comprobar cada genotipo se necesitan al menos 50 árboles de cada individuo (Zeaser

1998. Comunicación personal, ensayos de polinización cruzada en melina).

Por cultivo de tejidos, es posible reproducir este material en cantidades suficientes para ser evaluado genéticamente en el campo y posteriormente, iniciar los programas de reforestación basados en la silvicultura clonal. Con el uso de técnicas de cultivo *in vitro*, Kannan y Jasrai (1996), reportan que de un nudo de *Gmelina arborea* se pueden obtener 144 plántulas en 3 meses. A nivel internacional se reportan algunos estudios realizados en este campo (Kannan y Jasrai 1996), pero a nivel nacional no se encontró ningún reporte sobre la utilización de técnicas de cultivo *in vitro* en melina. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue validar la metodología para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Gmelina arborea* a partir de semillas y evaluar el comportamiento inicial del material vegetal en la fase de enraizamiento.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Se utilizó semillas de melina (*Gmelina arborea*) proporcionadas por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), clasificada como semilla autorizada tipo B y de procedencia BL026/94X Hojancha, Guanacaste.

Medio de cultivo

El medio de cultivo consistió de las sales minerales de Murashige y Skoog (MS) (1962), con 30 g/L de sacarosa y 2.8 g/L de Phytigel. El pH se ajustó a 5.7 antes del autoclavado. El medio se dispensó en frascos Gerber grandes. Para algunas pruebas se modificó la concentración de las sales y se adicionó bencilaminopurina (BAP) al medio de cultivo.

Desinfección y establecimiento *in vitro*

Endocarpos. Los endocarpos de melina se incubaron en etanol de 50° y 70° en agitación

por periodos de 15 y 20 min para cada tratamiento. Luego se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril en condiciones asépticas y se dejaron en la cámara de flujo laminar, en agua destilada estéril, durante 2 días. El agua se cambió cada 5 h aproximadamente, excepto durante la noche. Posteriormente, los endocarpos se inocularon en el medio MS. La contaminación se evaluó una semana después.

Escarificación y establecimiento *in vitro* de semillas. Antes de aplicar los tratamientos para la extracción de las semillas, los endocarpos se desinfectaron con cloro comercial (NaOCl al 3% i.a.) por 20 min y se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar. Los tratamientos evaluados para la escarificación fueron: a) endocarpos inmersos en agua por 48 h (testigo); b) inmersión en ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 al 96%) por 10 min y luego en agua por 48 h; c) inmersión en agua por 48 h con flameado cada 12 h; d) línea de sutura lijada e inmersión de los endocarpos en agua por 48 h. En todos los tratamientos se utilizó agua destilada autoclavada, la cual se cambió cada 5 h, excepto en las noches. Pasado este periodo se procedió a aislar e inocular las semillas en el medio de cultivo MS. Para cada tratamiento se extrajeron e inocularon 30 semillas. Para el análisis de datos en la desinfección y rompimiento de testa, se aplicó un diseño completamente al azar con 4 tratamientos, 4 repeticiones y 30 endocarpos por repetición. La evaluación se hizo con base en el porcentaje de endocarpos que sufrieron ruptura de la testa y el porcentaje de germinación y contaminación de las semillas inoculadas por tratamiento.

Multiplicación

El material vegetal utilizado durante esta etapa fueron las plántulas obtenidas de las semillas establecidas y germinadas *in vitro*. Estas plántulas se seccionaron en los entrenudos, de manera que cada explante consistió de un nudo. Los explantes se inocularon en el medio de cultivo MS modificado de acuerdo al tratamiento. Se evaluó el efecto de la concentración de BAP (0, 0.5 y 1.0 mg/L) en la organogénesis del material. Para evaluar el efecto de la concentración de sales inorgánicas sobre la multiplicación de melina,

se utilizó el medio de cultivo MS con: a) la concentración de sales completa (MS), b) la concentración de sales reducida al 50% (MS/2) y c) la concentración de sales reducida al 25% (MS/4). En todos los casos, el medio de cultivo se enriqueció con 0.5 mg/L de BAP. Se utilizó un diseño completamente al azar con 34 repeticiones. La unidad experimental correspondió a un nudo. La evaluación se hizo con base en el número de brotes/explante y en el número de nudos/brote que se formaron después de 4 semanas de cultivo.

Enraizamiento

Para esta etapa del proyecto se utilizó brotes obtenidos durante la fase de multiplicación. Los brotes se separaron del explante inicial y se inocularon en el medio de cultivo correspondiente según el tratamiento a evaluar. Los tratamientos evaluados fueron: a) concentración de sales completa (MS) y b) al 50% de la concentración de sales (MS/2). La unidad experimental consistió de un brote y cada tratamiento de 80 repeticiones. La evaluación se hizo con base en el número de raíces por brote y la longitud de la raíz más larga, 4 semanas después de iniciado el experimento.

Análisis de datos

Para analizar los resultados obtenidos en cada fase del proyecto se realizó un análisis de variancia (ANDEVA) y pruebas de comparación de medias entre los tratamientos (Tukey).

RESULTADOS Y DISCUSION

Desinfección y establecimiento *in vitro*

Endocarpos. Análisis realizados en la Universidad de Costa Rica, han indicado una alta frecuencia de esporas de *Fusarium* spp. en endocarpos de melina limpios y secos (Zeaser D. 1998. Comunicación Personal). Esta situación hace necesaria la desinfección del material a utilizar para la micropropagación, ya que el medio de cultivo brinda las condiciones ideales para que

los microorganismos proliferen causando la pérdida de los materiales (Abdelnour y Escalante 1994). Durante este estudio se utilizó etanol como desinfectante, en diferentes concentraciones y tiempos de incubación, ya que ha probado ser muy efectivo para la eliminación de éstos y otros microorganismos (CIAT 1991). A pesar de que el etanol es muy utilizado como desinfectante, en el caso de los endocarpos de melina no resultó eficaz, todos los tratamientos evaluados presentaron 100% de contaminación por hongos, 7 días después de inoculados en el medio de cultivo (los datos no se muestran). Esta situación puede explicarse con base en el hecho de que los endocarpos de melina son huecos por dentro, como resultado del desarrollo ontogénico de las flores (Moreira y Arnáez 1992), y es muy probable que en esta cavidad se encontraran gran cantidad de esporas que no fueron afectadas por la acción del etanol.

En forma natural, la acción de organismos del suelo (insectos, hongos), la humedad y las temperaturas cálidas del sustrato rompen la dureza del endocarpo lo que permite la germinación de las semillas de melina (Jara 1996). Sin embargo, estas condiciones no son favorecidas cuando se usa la técnica de cultivo *in vitro*. Al ser un cultivo aséptico, el medio de cultivo se encuentra libre de la acción de microorganismos, por lo tanto, si se lograran desinfectar e inocular los endocarpos de melina, es muy probable que las semillas no germinen porque la dureza e impermeabilidad del endocarpo serían factores de latencia muy fuertes. Por lo anterior y tomando en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas anteriores, se consideró como mejor opción aislar e inocular la semilla.

Desinfección y extracción de semillas

La semilla de melina se encuentra en pequeñas depresiones dentro del endocarpo y protegidas por una cubierta de tejido duro. Esta característica particular de la especie hace suponer que en estado natural, las estructuras internas de la semilla se encuentran libres de hongos y bacterias, por lo tanto, si se extraen e inoculan en condiciones asépticas podrían germinar y desarrollarse *in vitro* sin peligro de contaminación.

Entre los tratamientos de escarificación evaluados (Cuadro 1), se encontró una diferencia altamente significativa en cuanto a ruptura de la testa ($P \leq 0.01$), donde el más efectivo fue el que incluyó la incubación de los endocarpos en ácido sulfúrico concentrado por 10 min, ya que permitió el rompimiento del 70% de las testas. Cuando se lijó la sutura, se incubaron en agua y se flamearon los endocarpos, los tratamientos no difirieron entre ellos (35%, 39% y 45% de rompimiento de testa, respectivamente).

Cuadro 1. Ruptura de testa, germinación y contaminación de semillas de melina (*G. arborea*) introducidas al cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Ruptura de testa (%)	Semillas germinadas (%)	Semillas contaminadas (%)
(Agua)	39 b*	100	40
(H ₂ SO ₄ + Agua)	70 a	100	40
(Fuego + Agua)	45 b	40	20
(Lija + Agua)	35 b	90	57

$P \leq 0.01$

Estos resultados coinciden con las recomendaciones del Centro de Semillas Forestales de Danida (1991) y de Trujillo (1986), quienes citan el ácido sulfúrico concentrado como la sustancia química más utilizada para romper la latencia producida por la impermeabilidad de la cubierta de las semillas.

En el Cuadro 1 también se observa el efecto de los tratamientos de escarificación sobre la germinación y la contaminación de las semillas. Los diferentes tratamientos resultaron en una alta germinación de las semillas (100%, 100% y 90% para la incubación en agua, ácido sulfúrico y lijado respectivamente). Estos porcentajes fueron calculados con base en el número de semillas que mostraron ruptura de la testa. La excepción fue el tratamiento que incluyó el flameado de los endocarpos, que afectó el material obteniéndose apenas un 40% de semillas germinadas. Posiblemente, la temperatura generada durante el flameado fue perjudicial para el embrión.

La contaminación obtenida para cada tratamiento se consideró aceptable debido al problema

que representa la desinfección de los endocarpos; sin embargo, sería posible disminuir estos índices con una desinfección más drástica o con el uso de algún desinfectante de efecto menos drástico a las semillas antes de inocularlas en el medio de cultivo.

Con base en los resultados obtenidos durante la etapa de desinfección y extracción de las semillas de melina, se puede inferir que el tratamiento más efectivo para romper la latencia exógena, sin afectar la germinación y controlando la contaminación *in vitro*, consistió en lavar los endocarpos con cloro comercial (NaOCl al 3% i.a.) por 20 min, sumergir los endocarpos en ácido sulfúrico concentrado por 10 min y en agua destilada y autoclavada por 48 h, con cambios cada 5 h durante el día.

Multiplicación

Efecto del BAP en la organogénesis. El BAP es un regulador del crecimiento muy utilizado para inducir la brotación en especies forestales. Según Bonga y Durzan (1985), probablemente es uno de los reguladores de crecimiento más potentes disponibles para este propósito. Esto debido a que también induce la producción de hormonas naturales, tales como la zeatina y en consecuencia provocan la organogénesis. Como se observa en el Cuadro 2, las principales variables evaluadas fueron el número de brotes/explante y el número de nudos/explante, necesarios para la multiplicación nodal de melina. Existe una diferencia altamente significativa entre los tratamientos $P \leq 0.01$, tanto para el número de brotes/explante como para el número de nudos/brote; donde los mejores tratamientos fueron 0.5 mg/L de BAP que indujo 2.41 brotes/explante y 7.32 nudos/brote y 1.0 mg/L de BAP que indujo la producción de 2.71 brotes/explante y 6.59 nudos/brote. La ausencia del fitoregulador del crecimiento en el medio de cultivo, resultó en una baja producción de brotes/explante (1.03) y de nudos/brote (2.56). Este resultado indica la necesidad de este regulador del crecimiento para la multiplicación del material. Los resultados obtenidos se aproximan a los de Kannan y Jasrai (1996), quienes incubaron explantes de melina de un nudo en MS con 0.5 mg/L de BAP y obtu-

vieron 4 brotes/explante y entre 5 y 7 nudos/brote; agregando concentraciones mayores de BAP no lograron aumentar la producción de brotes. A la vez obtuvieron solo un brote/explante cuando no se adicionó el regulador de crecimiento.

Cuadro 2. Efecto del BAP en la inducción de brotes, formación de nudos y vitrificación de explantes de melina (*G. arborea*), después de 4 semanas de crecimiento *in vitro*.

BAP (mg/L)	Brotes/explante (#)	Nudos/explante (#)	Vitrificación (%)
0	1.03b*	2.56b	17
0.5	2.41a	7.32a	9
1.0	2.71a	6.59a	29

$P \leq 0.01$

Estadísticamente, entre los tratamientos con BAP no existen diferencias significativas $P \leq 0.05$ para las variables mencionadas; por lo tanto, para definir el mejor tratamiento se recurrió a evaluar el porcentaje de brotes vitrificados en ambas concentraciones (Cuadro 2). Debido a que el tratamiento con 0.5 mg/L de BAP produjo solo 9% de los brotes vitrificados, comparado con 29% de vitrificación cuando se agregó 1.0 mg/L de BAP, el primero se consideró el tratamiento más recomendable para lograr la multiplicación de los explantes y la obtención de brotes de mayor calidad.

Stange y colaboradores (1998), indican que uno de los problemas del cultivo *in vitro* de embriones en *Pinus radiata*, es que se genera una proporción significativa de brotes con hojas hiperhidratadas (vitrificación) y citan que un adecuado manejo de los factores ambientales durante el cultivo *in vitro*, debería ser suficiente para lograr una producción de brotes de óptima calidad. Sin embargo, otros autores mencionan la concentración de reguladores del crecimiento como otro factor importante a considerar (CIAT 1991).

Efecto de la concentración de sales en el medio de cultivo. Para las diferentes especies forestales se reportan diferentes concentraciones óptimas de macroelementos, microelementos y hierro. En *Pinus counterrei* se observó una buena

formación de brotes con 1.5X la concentración normal de sales, mientras que en *P. taeda* este óptimo se alcanza con 0.5X (Bonga y Durzan 1985). En ciprecillo (*Prumnopitys standleyi*) su crecimiento no se vió afectado al inocularse en el medio MS con 1X, 0.5X ó 0.25X la concentración de sales (Gamboa y Gamboa 1997). Esto confirma que muchas especies forestales requieren de una concentración específica de sales inorgánicas.

En esta etapa del proyecto, se determinó el efecto de la concentración de sales inorgánicas en el medio de cultivo sobre la multiplicación del material. Se tomó como testigo el tratamiento MS con 0.5 mg/L de BAP que resultó ser el más efectivo en las pruebas realizadas. Este se comparó con los tratamientos en que se disminuyó la concentración de sales en el medio de cultivo. Conforme el medio de cultivo se hizo más pobre en elementos minerales (Cuadro 3), el valor de las variables evaluadas disminuyó, obteniéndose

2.71, 2.41 y 1.03 brotes/explante y 7.32, 4.35 y 2.97 nudos/explante cuando se utilizó el MS completo, MS/2 y MS/4 respectivamente. La Figura 1a muestra explantes de melina en estos tratamientos. El porcentaje más bajo de vitrificación (9%) se observó en los brotes que crecieron en el medio de cultivo con la concentración de sales completa.

Cuadro 3. Efecto de la concentración de sales y la adición de 0.5 mg/L de BAP en el medio de cultivo sobre la brotación, formación de entrenudos y vitrificación de explantes de melina (*G. arborea*), después de 4 semanas en cultivo.

Tratamiento	Brotos/explante (#)	Nudos/explante (#)	Vitrificación (%)
MS	2.71 a	7.32 a	9
MS/2	2.41 b	4.35 b	29
MS/4	1.03 b	2.97 c	26

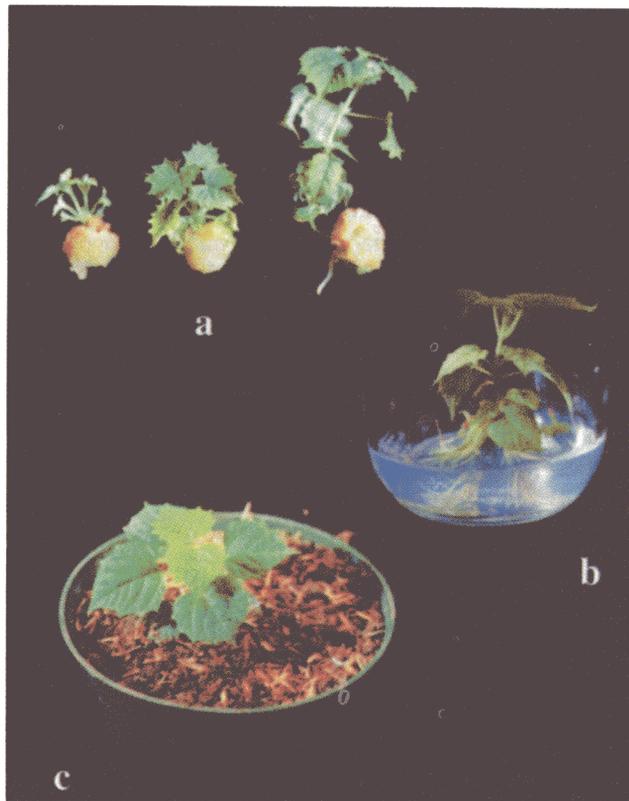


Fig. 1. a) Brotes de *Gmelina arborea* cultivados en medio MS con la concentración de sales diluida al 25%, al 50% y completa, respectivamente. b) Plántula enraizada bajo condiciones *in vitro*. c) Plántula producida por micropropagación, después de 4 semanas de crecimiento bajo condiciones de invernadero.

Con base en los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas se puede sugerir que el medio de cultivo MS con la concentración de sales completa y con 0.5 mg/L de BAP, estadísticamente $P \leq 0.01$, resultó ser el tratamiento más efectivo para la multiplicación nodal de melina.

Enraizamiento

Se evaluó el efecto de la concentración de sales en el medio de cultivo MS sobre el enraizamiento *in vitro* de brotes de melina. De acuerdo con el Cuadro 4, la inducción de raíces ocurre tanto en el medio MS completo, como el MS con la concentración de sales reducida a la mitad; sin embargo, el porcentaje de enraizamiento alcanzado no puede considerarse óptimo (42.5% y 36.2% respectivamente). Estadísticamente no existe diferencia significativa $P > 0.05$ entre los tratamientos ni para el número de raíces, ni para la longitud de la raíz más larga. Por lo tanto, para la etapa de enraizamiento *in vitro* es indiferente utilizar un medio MS completo o con la concentración de sales diluidas al 50%. Estos resultados confirman los obtenidos por Roy y colaboradores (1992), que utilizaron el medio MS diluido al 50% para el enraizamiento *in vitro* de brotes de melina; sin embargo, estos autores enriquecieron el medio con 1.0 mg/L de AIB y de AIA, logrando un 80% de enraizamiento. Por otra parte, Kannan y colaboradores (1996), utilizaron AIB para el enraizamiento de brotes de melina *in vitro*. Esto sugiere que es posible aumentar los porcentajes de enraizamiento de melina si se aplica alguno de estos reguladores de crecimiento al medio de cultivo. Los resultados obtenidos durante estas pruebas sugieren que la concentración de sales utilizada en el medio de cultivo no afecta el proceso de enraizamiento *in vitro* de melina y que sería recomendable continuar la investigación en esta etapa de la micropropagación. La Figura 1b muestra una planta de melina enraizada bajo condiciones *in vitro*.

Cuadro 4. Efecto de la concentración de sales en el medio de cultivo, sobre el enraizamiento *in vitro* de brotes de melina (*Gmelina arborea*).

Tratamiento	Enraizamiento (%)	Raíces/brote (#)	Longitud de la raíz más larga/brote (cm)
MS	42.5	6.00	1.47
MS/2	36.2	6.16	1.72

Ensayos preliminares mostraron la factibilidad de aclimatar bajo condiciones de invernadero, las plántulas de melina enraizadas *in vitro* durante la presente investigación (Figura 1c).

LITERATURA CITADA

- ABDELNOUR, A.; ESCALANTE, J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 38 p.
- ARNAEZ, E.; MOREIRA, I. 1992. Estudio morfológico de once especies forestales de bajura. Departamento de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 79 p.
- BONGA, M.; DURZAN, D. 1985. Tissue culture in forestry. Vol. 2. Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands. 420 p.
- BOLSTAT, P.; BAWA, K. 1995. Self incompatibility in *Gmelina arborea* (Verbenaceae). *Silvae Genetica* 31:19-21.
- CENTRO DE SEMILLAS FORESTALES DE DANIDA. 1991. Guía para la manipulación de semillas forestales, con especial referencia en los trópicos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 502 p.
- GAMBOA, J.P.; GAMBOA, K. 1997. Estudios conducentes al establecimiento *in vitro* de ciprecillo (*Prumnopitys standleyi*) y pilón (*Hyeronima alchorneoides*), especies nativas de Costa Rica. Informe de Investigación, Vicerrectoría de Investigación y Extensión, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 40 p.
- GONZALES, C.; VILCA, J. 1996. Micropropagación vegetativa *in vitro* de aliso (*Alnus acuminata*). Asociación Civil para la Investigación y Desarrollo Forestal. Cajamarca, Perú. 24 p.

- JARA, L. 1996. Biología de semillas forestales. Serie materiales de enseñanza # 36. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 31 p.
- KANNAN, V.; JASRAI, Y. 1996. Micropropagation of *Gmelina arborea*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46:269-271.
- MESEN, F. 1996. Justificación económica del mejoramiento genético forestal. In: Memorias primer seminario nacional sobre mejoramiento genético y semillas forestales. Ed. por F. Mesén, Y. Rodríguez y A. Sánchez. Santo Domingo, República Dominicana. p. 1-9.
- MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos *in vitro*. In: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por Roca W.M. y Mroginski L.A. CIAT, Cali, Colombia. p. 19-40.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- MURILLO, O. 1992. Necesidad de programas de producción de semilla mejorada para la reforestación en Costa Rica. In: II Congreso Forestal Nacional. San José, Costa Rica. p. 7-9.
- STANGE, C.; PREHN, D.; GEBAUER, P.; JOHNSON, A. 1998. Caracterización morfológica y molecular de clones de *Pinus radiata* regenerados *in vitro*. In: III Encuentro latinoamericano de biotecnología vegetal. 1-5 jun. Habana, Cuba. p. 252-253.
- TORRES, G.; LUJAN, R.; PINEDA, M. 1995. Diagnóstico técnico del proceso de producción forestal en plantaciones de pequeña escala en Costa Rica. Centro Investigación Bosque Industria. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 105 p.
- TRUJILLO, E. 1986. Manual general sobre el uso de semillas forestales. Instituto Nacional de los Recursos Naturales Renovables y del Medio Ambiente. Bogotá, Colombia. 55 p.