

MICROPROPAGACIÓN DE *Dracaena deremensis*¹

Mónica Blanco*, Roberto Valverde*², Luis Gómez*

Palabras clave: *Dracaena deremensis*, propagación *in vitro*, aclimatización.

Keywords: *Dracaena deremensis*, *in vitro* propagation, acclimatization.

RESUMEN

Dracaena deremensis var. Janet Craig es una planta ornamental de exportación. Debido a su valor, y a la aparición espontánea de mutantes de esta variedad en el campo, también con valor para incursionar en el mercado internacional, es muy deseable contar con métodos eficientes para la micropropagación acelerada de estas plantas. En el presente estudio, la inducción de brotes múltiples ocurrió en la base de ápices caulinares cultivados en el medio de Murashige y Skoog (1962) (MS), suplementado con auxinas y citocininas en diferentes concentraciones y combinaciones, para un total de 87 tratamientos con 10-25 repeticiones cada uno. La tasa de multiplicación más alta, 5,6 brotes por explante, se obtuvo a las 3 semanas en un MS al que se le adicionó 1 mg l⁻¹ de ácido α -naftalenacético (ANA) y 1 mg l⁻¹ de kinetina (KIN). El enraizamiento ocurrió cuando los brotes producidos fueron separados del explante y cultivados en un MS sin reguladores de crecimiento. Durante la fase de aclimatización el 100% de las plántulas fueron establecidas con éxito en el invernadero. Este protocolo no solo fue eficiente para la micropropagación de la variedad Janet Craig sino también para un mutante de esta variedad; los resultados mostraron un 100% de coincidencia en la respuesta *in vitro* de ambas plantas.

ABSTRACT

Micropropagation of *Dracaena deremensis*. *Dracaena deremensis* var. Janet Craig is an ornamental export plant. Due to its value, and the occurrence in the field of spontaneous mutants of the same species, also valuable in the international market, efficient methods for rapid propagation of these plants are highly desirable. In this study, multiple shoots were induced on the bottom of caulinar apices of *D. deremensis* cultured on Murashige and Skoog (1962) (MS) medium supplemented with different concentrations and combinations of auxins and cytokinins, for a total of 87 treatments with 10-25 replicates each. The highest shoot multiplication rate was achieved on MS medium containing 1mg l⁻¹ of α -naphthalenacetic acid (NAA) and 1 mg l⁻¹ of kinetin (KIN), which produced an average of 5,6 shoots after three weeks in this culture medium. *In vitro* rooting occurred in an MS medium devoid of growth regulators. *In vitro* plants were successfully acclimatized under greenhouse conditions. This protocol was efficient not only for micropropagating Janet Craig, but also for a mutant of the same variety. Results showed a 100% coincidence on both plants *in vitro* response.

1/ Recibido el 08 de octubre de 2003. Aceptado el 12 de enero de 2004.

2/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: robertov@cariari.ucr.ac.cr

* Biotecnología de Plantas, Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

Dentro de la familia Agavaceae se encuentran 2 géneros que presentan características muy semejantes: *Dracaena* y *Cordyline*. Se conoce alrededor de 150 especies de *Dracaena* y 15 de *Cordyline*; sin embargo, apenas 20 ó 30 se cultivan con fines ornamentales (Sánchez de Lorenzo 2003).

La *Dracaena* spp. se encontró inicialmente en las Islas Canarias y de allí se trajo a los trópicos americanos, donde presenta un crecimiento exuberante (Botanical Growers 2003). Es una planta ornamental, conocida por su apariencia y facilidad para crecer en ambientes interiores, ya que crece sin problemas en ambientes claros con luz indirecta, pero también puede tolerar poca luz (Clemson 2003). Se conoce alrededor de 30 especies dentro de este género, entre ellas *D. marginata*, *D. deremensis*, *D. fragrans*, *D. reflexa*, *D. godseffiana* y *D. warneckii*.

Dentro de la especie *D. deremensis* existen variedades como la “Janet Craig”, la cual es utilizada comúnmente en interiores y se caracteriza por sus hojas gruesas, oscuras y brillantes. Esta variedad puede crecer hasta 305 cm (10 pies). La variedad “Compacta” posee hojas de aproximadamente 12,7 cm (5 pulgadas) que crecen apiñadas en un tallo de lento crecimiento. La “Warneckii” es una planta variegada (verde con líneas blancas) que logra sobrevivir con muy poca luz y puede alcanzar hasta 122 cm (4 pies) de altura, y la variedad “Bausei” posee hojas de aproximadamente 45,7 cm (18 pulgadas) de ancho en tallos que crecen hasta 122 cm (4 pies) de alto; ésta variedad se caracteriza por tener una sola línea blanca en el centro de cada una de las hojas (Clemson 2003).

Las dracaenas son multiplicadas por esquejes apicales de tallo o de trozos de tallo de 5-8 cm de longitud, que son enraizados con el uso de reguladores de crecimiento. Posteriormente, los esquejes se colocan en una mezcla de turba y arena tratada con fungicidas. En estas condiciones el enraizamiento se produce al mes de la siembra. También, esta planta se reproduce por semilla; sin embargo, para que la planta florezca debe someterse a temperaturas inferiores a los 12-14°C o a un

tratamiento con ácido giberélico. Los racimos tardan de 4-6 meses en madurar y la germinación se produce a las 6-8 semanas de la siembra (Infoagro 2003, Sánchez de Lorenzo 2003).

Casi todas las variedades de *Dracaena* y *Cordyline* tienen una gran demanda tanto en el mercado local como internacional. En algunas ocasiones en los campos de reproducción aparecen mutantes o quimeras de estas especies, algunas de ellas con características de gran valor en el mercado internacional. En estos casos los métodos de propagación convencionales resultan insuficientes para reproducir la planta en forma masiva y llegar al mercado en el menor tiempo posible. De esta forma, el cultivo de tejidos se convierte en una herramienta que permite la micropropagación clonal y masiva del material de interés, el cual además estará libre de plagas y enfermedades. En ornamentales el cultivo *in vitro* ha tenido un gran impacto histórico, científico y económico, probablemente por el valor intrínseco del producto final (Debergh y Read 1991, De Fosard 1986).

Mediante el cultivo *in vitro* de brotes del tallo se ha logrado establecer protocolos para *D. marginata* “Tricolor” (Chua *et al.* 1981) y *D. fragrans* (Vinterhalter y Vinterhalter 1992, Vinterhalter *et al.* 1990). Dichos protocolos son muy específicos para las especies para las que fueron creados, lo que confirma que cada genotipo requiere de condiciones especiales de desinfección, nutrición y crecimiento. Por tal motivo, el objetivo de éste trabajo fue establecer un protocolo para la micropropagación de la planta ornamental *Dracaena deremensis* var. Janet Craig.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica.

Material vegetal

Como material madre se utilizó esquejes de aproximadamente 15 cm de altura, con 1 ó 2 brotes de 6-10 cm de largo (Figura 1a). Los esquejes

fueron mantenidos en el invernadero y asperjados semanalmente con Agrimicín y Benlate (1 g l^{-1} de cada uno). Los brotes fueron separados del tallo, se les eliminó las hojas y el tejido externo hasta obtener un explante de aproximadamente 5 cm de longitud (Figura 1b).

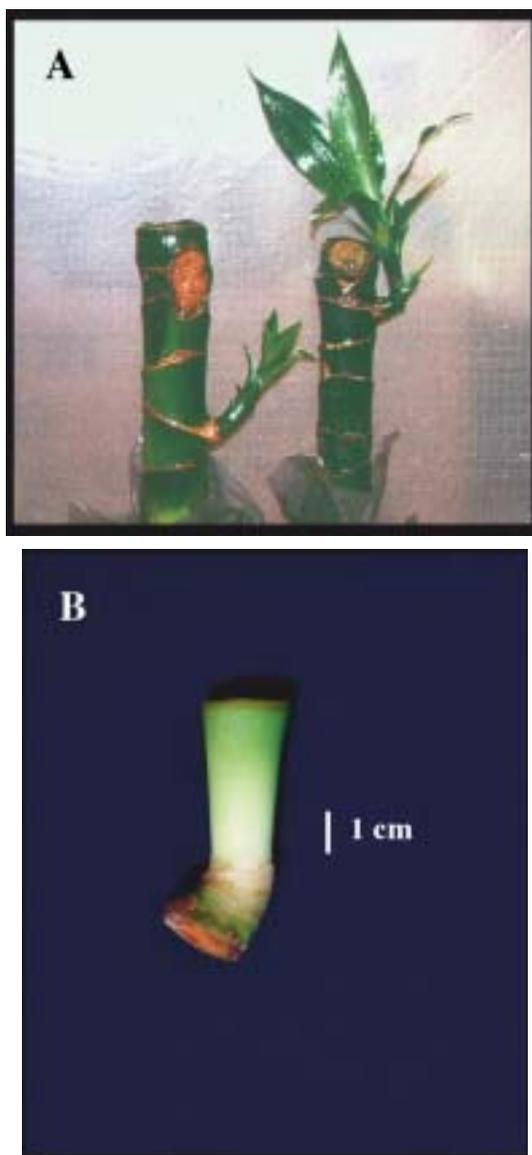


Fig. 1. A. Esquejes de *D. deremensis* var. Janet Craig utilizados como material madre. B. Brotes separados del esqueje.

Establecimiento

Desinfección. Para el desarrollo de la metodología de desinfección de los explantes, se realizó un ensayo utilizando 3 diferentes tratamientos:

1- Los explantes fueron colocados en agua desionizada durante su preparación. Posteriormente, se colocaron en etanol al 70% por 1 min, luego fueron transferidos a una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2,5% (cloro comercial al 5%) con una gota de Tween-20 por 20 min., ambos pasos se realizaron en agitación constante. Finalmente, dentro de la cámara de flujo laminar, los explantes fueron lavados 3 veces con agua destilada estéril.

2- Los explantes fueron colocados en una solución de 100 mg l^{-1} de ácido ascórbico durante 30 min. Posteriormente, se pusieron en una solución con 2 g l^{-1} de Agry-gent y 2 g l^{-1} de Benlate durante 20 min., luego se pasaron por etanol al 70% por 1 min. y después a una solución de NaOCl al 2% (cloro comercial al 5%) con una gota de Tween-20 por 20 min. Todos los pasos de este procedimiento fueron realizados en agitación constante. Una vez terminados los 20 min. y dentro de una cámara de flujo laminar, los explantes fueron lavados 3 veces con agua destilada estéril.

3- Este tratamiento es similar al anterior, excepto porque los explantes estuvieron en la solución de Agry-gent y Benlate por 30 min. en lugar de 20 min. y porque al NaOCl se le adicionó 100 mg l^{-1} de ácido ascórbico.

Medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog (MS) (1962), suplementado con 2 mg l^{-1} de ácido α -naftalen acético (ANA), 8 g l^{-1} de agar, 10 g l^{-1} de Polivinil pirrolidona (PVP) como antioxidante y 30 g l^{-1} de sacarosa. El pH del medio fue ajustado a 5,8 antes del autoclavado, el cual se realizó a 121°C por 25 min. Se dispensó 15 ml de medio de cultivo en tubos de $25 \times 150 \text{ mm}$.

Luego de la desinfección de los brotes de 3-5 cm., estos fueron disectados en la cámara de flujo laminar. El explante final inoculado en el medio de cultivo tuvo un tamaño de 0,5-1 cm de longitud y una base de 0,5 cm de diámetro (Figura 2).



Fig. 2. Tamaño inicial del explante de *D. deremensis* var. Janet Craig para su establecimiento *in vitro*.

Multiplicación

Para la multiplicación se utilizó nuevamente el medio básico de Murashige y Skoog (MS) (1962), suplementado con 30 g l⁻¹ de sacarosa y 8 g l⁻¹ de agar. Los reguladores de crecimiento fueron aplicados como combinaciones de auxinas y citoquininas. Como auxinas se utilizó el ácido 3-indolacético (AIA) en concentraciones de 0,01 a 20 mg l⁻¹ y el ácido α -naftalenacético (ANA) en concentraciones de 0,01 a 10 mg l⁻¹. Como citoquininas se utilizó la N⁶-benciladenina (BA) en concentraciones de 0,01 a 10 mg l⁻¹ y la kinetina (KIN) en concentraciones de 0,1 a 10 mg l⁻¹. También se probó con AIA, ANA y BA en forma independiente. Los reguladores de crecimiento generaron 87 tratamientos, el número de repeticiones varió de 10 a 25 por tratamiento. El medio de cultivo fue renovado a las 2, 3 y 4 semanas, momento en que se evaluó la tasa de multiplicación de los explantes.

Enraizamiento

Los brotes producidos en la fase de multiplicación fueron separados de los explantes de donde se originaron, y transferidos al medio MS con concentraciones de 2,4-D que variaron de 0,1 a 2 mg l⁻¹.

Condiciones de cultivo

En las 3 fases antes descritas, los tejidos fueron cultivados a una temperatura de 24±1°C, con un fotoperíodo de 16 h y luz fluorescente a 46 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Acclimatización

Brotos enraizados de aproximadamente 4 cm fueron removidos de los frascos de cultivo y el medio adherido a las raíces fue eliminado totalmente mediante lavado. Las plántulas fueron mantenidas en una solución de Benlate (2 g l⁻¹) y Agrymicín (2 g l⁻¹) por 1 hora, luego de este tiempo las plántulas fueron sembradas en un sustrato compuesto por suelo y fibra de coco en proporción 1:1, esterilizado con calor. Una vez en las bandejas, las plántulas fueron colocadas por 1 semana en un túnel cubierto por plástico. Durante la semana siguiente el plástico fue levantado paulatinamente hasta que se eliminó en forma total, quedando las plantas al descubierto.

El riego se aplicó por aspersión 2 veces por semana. También cada semana las plántulas fueron asperjadas 3 veces, utilizando en forma alterna, uno de los siguientes productos: Raizal (2 g l⁻¹), Multiminerales (2 ml l⁻¹), Urea (2 g l⁻¹), 12-60-0 (5 g l⁻¹) y 20-20-20 (2 g l⁻¹). Cada 3 semanas fue aplicado el fungicida Daconil (5 ml l⁻¹) y 1 vez por semana, en forma alterna, los insecticidas: Basudín (5 ml l⁻¹), Lorsban (2 ml l⁻¹), Vydate (2,5 ml l⁻¹) y Decis (2 ml l⁻¹).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Material vegetal

El hecho de tener los esquejes donadores de explantes en el invernadero, no solo facilitó la obtención de los explantes, sino que permitió tratarlos con fungicidas y bactericidas, lo que eliminó gran parte de la contaminación que se produce cuando los explantes vienen directamente del campo.

El tamaño de los brotes fue seleccionado de acuerdo con la experiencia generada en pruebas preliminares, en este estudio se encontró que el tamaño de 5 cm para los brotes obtenidos a partir de los esquejes, antes de la desinfección, fue adecuado ya que no solo facilitó el manejo durante la desinfección superficial, sino que disminuyó la oxidación del explante y la necrosis del tejido, causada por la concentración de NaOCl utilizada. Este tamaño permitió que únicamente el tejido externo se necrosara y que la parte apical del explante quedara intacta para su posterior disección.

Establecimiento

Desinfección. De los tratamientos de desinfección utilizados se seleccionó el número 3, ya que este generó un 84,31% de material libre de cualquier contaminación en los estados iniciales de crecimiento del explante (Cuadro 1).

Se observó que la permanencia de los explantes en la solución de Agry-gent y Benlate por 30 min. reduce sustancialmente (34%) el porcentaje de contaminación, con respecto al tratamiento 2.

El ácido ascórbico utilizado en la fase inicial de la preparación de los explantes y durante la desinfección con el NaOCl redujo la oxidación del tejido durante la disección e inoculación *in vitro* de los explantes.

Aún cuando pareciera que la utilización del ácido ascórbico no tiene ingerencia en el proceso de contaminación, debe tomarse en cuenta que la ausencia de oxidación no solo le permite al explante establecerse más rápidamente, sino que evita la presencia de tejido dañado, que pueda ser sustrato para el crecimiento acelerado de bacterias endógenas. Este tipo de bacteria fue evidente en un período muy corto, en los tejidos

oxidados de los tratamientos 1 y 2, pero en el tratamiento 3 solo aparecieron, en muy pocos casos, durante las transferencias cuando se realizó algún corte al tejido.

Resulta claro observar que hubo una relación directamente proporcional entre el porcentaje de sobrevivencia y el de contaminación, lo cual indica que los diferentes tratamientos de desinfección fueron efectivos únicamente en el control de los contaminantes sin dañar los explantes (Cuadro 1). En otros experimentos, se ha observado que los tratamientos de desinfección son eficientes en el control de la contaminación, pero el daño causado al explante es letal, tal y como se ha observado durante la desinfección de la planta medicinal *Echinacea* sp. (Loaiza J., comunicación personal).

Medio de cultivo. En el medio de cultivo utilizado para el establecimiento de los explantes, en un periodo de 3 semanas se observó un crecimiento activo de los mismos (Figura 3). Este crecimiento fue favorecido por la presencia del PVP en el medio, el cual ayudó a reducir significativamente la oxidación inicial causada por los cortes realizados al explante durante su disección.

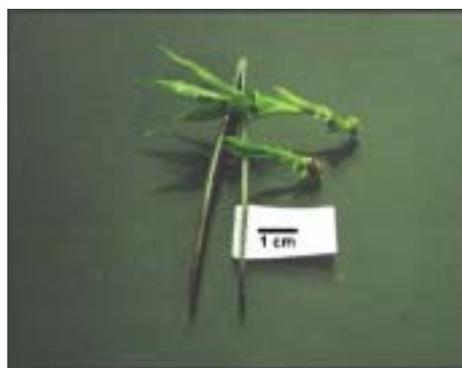


Fig. 3. Crecimiento de *D. deremensis* var. Janet Craig en el medio de establecimiento.

Cuadro 1. Porcentajes de sobrevivencia y contaminación obtenidos con los tratamientos de desinfección superficial.

| | Total de explantes | % de sobrevivencia | % de contaminación |
|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Tratamiento 1 | 43 | 23,26 | 76,74 |
| Tratamiento 2 | 33 | 50,16 | 49,84 |
| Tratamiento 3 | 51 | 84,31 | 15,69 |

En pruebas preliminares, donde fueron comparados el agar (8 g l^{-1}) y el Phytigel ($1,8 \text{ g l}^{-1}$), el Phytigel indujo un proceso de hiperhidricidad en los explantes, lo que provocó que se suspendiera su uso. Este fenómeno ha sido ampliamente documentado en diferentes especies y se indica que está directamente relacionado con la aplicación del Phytigel (Chacón *et al.* 2000, Nairn *et al.* 1995). La hiperhidricidad se refiere a órganos y tejidos que tienen una apariencia morfológica y funciones fisiológicas anormales (Debergh *et al.* 1992, Ziv 1991). Chacón *et al.* (2000) trabajando con *Dioscorea trifida* y *D. alata*, atribuyen la inducción de la hiperhidricidad en sus materiales a las propiedades físicas del Phytigel. Se ha encontrado que este induce un menor potencial mátrico en el medio de cultivo, lo que produce una mayor absorción de agua por las plantas. Por otra parte, Nairn *et al.* (1995) en trabajos con *Pinus radiata*, atribuyen los efectos negativos de este gelificante a su constitución química. En nuestro caso, las plantas a las que se les detectó un proceso de hiperhidricidad fueron transferidas a un medio con agar, donde el proceso cesó. En otros estudios, donde este proceso presenta serios problemas, han sido adicionados compuestos tales como hierro y magnesio, tal es el caso de *Dianthus caryophyllus* (Yadav *et al.* 2003), agentes gelificantes que contienen pectina (M-Gel), extractos de polisacárido de alga en *Eucalyptus* sp. (Whitehouse *et al.* 2002) o nitrato de plata en *Helianthus annuus* L. (Mayor *et al.* 2003).

Multiplicación

Cuando los explantes alcanzaron un tamaño de 1-2 cm. fueron transferidos a un medio de cultivo con los 87 diferentes tratamientos de reguladores de crecimiento para inducir la proliferación de los brotes. En ese momento se eliminó la parte externa del tejido de la base de los explantes, pues generalmente este se encontraba oxidado, producto de la manipulación inicial. Sin embargo, a partir de este momento ya no fue necesario el PVP en el medio, pues la oxidación cesó.

De los 87 tratamientos de reguladores de crecimiento utilizados, fueron seleccionados los 4 que presentaron características cualitativas deseables como color, forma y desarrollo del explante (Cuadro 2, Figura 4), así como las mejores tasas de multiplicación (Cuadro 3).



Fig. 4. Multiplicación de *D. deremensis* var. Janet Craig.

Cuadro 2. Características de las plántulas en los 4 medios de cultivo seleccionados para la micropropagación de *D. deremensis* var. Janet Craig.

| Tratamiento | Características |
|---|---|
| 0,1 mg l ⁻¹ ANA X 1 mg l ⁻¹ KIN | Aspecto de las hojas un poco débil y quebradizo. Buen color. Multiplicación en la base y la parte aérea del explante. |
| 1 mg l ⁻¹ ANA X 0,01 mg l ⁻¹ BA | Yemas muy alargadas, hojas con buena coloración y forma. La multiplicación es en la base del explante. |
| 1 mg l ⁻¹ ANA X 1 mg l ⁻¹ KIN | Tamaño medio, buen color y aspecto. La multiplicación es en la base y la parte aérea del explante. |
| 0,25 mg l ⁻¹ BA | Alargamiento principalmente de la yema principal, buen aspecto en todo el explante. |

Cuadro 3. Tasas de multiplicación en los tratamientos seleccionados para la micropropagación de *D. deremensis* var. Janet Craig.

| Tratamiento | Número de brotes | | |
|---|------------------|---------|------|
| | Iniciales | Finales | T.M. |
| 0,1 mg l ⁻¹ ANA X 1 mg l ⁻¹ KIN | 33 | 130 | 3,9 |
| 1 mg l ⁻¹ ANA X 0,01 mg l ⁻¹ BA | 39 | 138 | 3,5 |
| 1 mg l ⁻¹ ANA X 1 mg l ⁻¹ KIN | 25 | 139 | 5,6 |
| 0,25 mg l ⁻¹ BA | 18 | 55 | 3,1 |

T.M.=Tasa de multiplicación (Brotes finales/brotes iniciales)

Finalmente, de los 4 tratamientos antes mencionados, fue seleccionado el que contenía un MS suplementado con 1 mg l⁻¹ de ANA, 1 mg l⁻¹ de KIN. En este medio de cultivo se obtuvo una tasa de multiplicación de 5,6 brotes explante⁻¹ (Cuadro 3).

En los medios de cultivo restantes (no incluidos en el Cuadro 3), tanto los explantes como los brotes inducidos presentaron características que impidieron su uso, entre ellas: alteraciones en la forma de los brotes (anchos y pequeños), en la textura de las hojas (quebradizas, débiles, fruncidas), en la forma del tallo (muy delgado, muy grueso o delgado en la parte basal y grueso en la apical), así como la formación de yemas adventicias, las cuales no fueron de gran utilidad, pues fueron producidas en cantidades pequeñas y además una vez separadas del explante, estas o el explante mueren.

Con respecto a la renovación del medio de cultivo y a la tasa de multiplicación, se encontró que el período de 3 semanas fue el óptimo para la multiplicación y separación de los explantes.

Enraizamiento

Durante la evaluación de los medios de cultivo para el enraizamiento, se observó que los explantes enraizaron espontáneamente y en un 100% en el medio MS desprovisto de reguladores de crecimiento (testigo). La aparición de las raíces se observó en un período de 2 a 3 semanas luego de poner el explante en el medio.

Las raíces fueron finas, largas y generalmente ramificadas (Figura 5).



Fig. 5. Enraizamiento de *D. deremensis* var. Janet Craig.

Con las diferentes concentraciones de auxina, se obtuvo raíces gruesas, cortas, poco ramificadas o en algunos casos un sistema radical compuesto de una raíz principal sin ninguna ramificación, lo cual concuerda con las observaciones de George (1996). Según este autor, un buen sistema radical es importante, pues con suma frecuencia se observa que las raíces producidas *in vitro* no son funcionales, debido a que pueden carecer de conexión vascular con el resto de la planta o no desarrollan pelos radicales. En trabajos realizados con *Psychotria acuminata*, Lara *et al.* (2003) encontraron que las raíces de esta especie, producidas *in vitro*, eran sumamente frágiles y que morían cuando las plántulas eran llevadas al invernadero, por lo que fue necesario el uso de enraizadores en la fase de aclimatización para asegurar la sobrevivencia de las plántulas.

Las raíces desarrolladas en la fase *in vitro*, tanto en brotes individuales como en grupos de brotes en este estudio, continuaron su crecimiento en el invernadero, donde en un corto período se observó una gran proliferación a partir de las raíces iniciales.

Aclimatización

Durante el período de aclimatización se obtuvo un 100% de sobrevivencia de las plántulas. Este resultado viene a corroborar que el sustrato fibra de coco:suelo en proporción 1:1 es apropiado para la aclimatización de esta especie. También, la eliminación paulatina del plástico permitió que las plántulas se adecuaron al nuevo ambiente y comenzaron su proceso de fotosíntesis, lo cual facilitó su sobrevivencia. George (1996) indica que en el cultivo *in vitro*, por las características propias del sistema, las plántulas son básicamente heterotróficas y poseen cutículas sumamente delgadas. De allí que la confección de túneles con plástico transparente para su aclimatización, tiene como objetivo mantener una alta humedad relativa, que impida la deshidratación de las plántulas. Por otro lado, el plástico transparente permite el paso de luz en una cantidad suficiente para que las plántulas empiecen a fotosintetizar.

El éxito en la aclimatización de las plántulas de esta especie, se debió no solo a las características del sistema de aclimatización sino también a la buena condición, tamaño y apariencia de las plántulas producidas *in vitro*, lo cual influyó en su sobrevivencia *ex vitro*. Durante el crecimiento de las plántulas en el invernadero no se observó ninguna alteración morfológica (Figura 6).

La creación de un protocolo para la micropropagación eficiente de *Dracaena deremensis* var. Janet Craig, también nos permitió evaluar el comportamiento de un mutante de la misma especie, que apareció en forma espontánea en el campo, y cuya variegación lo convierte en una planta de gran valor comercial. Los resultados obtenidos indican una coincidencia del 100% en la respuesta a la micropropagación de ambos materiales.



Fig. 6. Aclimatización de *D. deremensis* var. Janet Craig.

LITERATURA CITADA

- BOTANICAL GROWERS. 2003. Tropical Dracaena plants. <http://botanicalgrowers.com>
- CAPELLADES-QUERALT M., BERUTO M., VANDERS-CHAEGHE A., DEBERGH P.C. 1991. Ornamentals. *In: Micropropagation. Technology and application.* Kluwer. Netherlands. 484 p.
- CHACON A.G., SABORIO F., GOMEZ L., TORRES S., VALVERDE R. 2000. El tipo de gelificante en el desarrollo *in vitro* y la aclimatización de plantas de yampi (*Dioscorea trifida*) y ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Costarricense* 24(2): 57-64.
- CHUA B., KUNISAKI J., SAGAWA Y. 1981. *In vitro* propagation of *Dracaena marginata* "Tricolor". *HortScience* 16(4): 494.
- CLEMSON EXTENSION. 2003. Dracaena. <http://hgic.clemson.edu/factsheets/HGIC1504.htm>
- DEBERGH P. 1976. An *in vitro* technique for the vegetative multiplication of chimaeral plants of *Dracaena* and *Cordyline*. *Acta Hort.* 64: 17-20.
- DEBERGH P., AITKEN-CHRISTIE J., COHEN D., GROUT B., VON ARNOLD S., ZIMMERMAN R., ZIV M. 1992. Reconsideration of the term "vitrication" as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 135-140.
- DEBERGH P., READ P.E. 1991. Micropropagation. *In: Micropropagation. Technology and application.* Kluwer. Netherlands. 484 p.

- DE FOSSARD. 1986. Principles of plant tissue culture. *In*: Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. Martinus Nijhoff. EE.UU. 371 p.
- GEORGE E.F. 1996. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd. England. 1361 p.
- INFOAGRO. 2003. Cordiline.
http://www.infoagro.com/flores/plantas_ornamentales/cordiline.asp
- LARA A., VALVERDE R., GOMEZ L., HIDALGO N. 2003. Micropropagación de la planta medicinal *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense* 27(2): 7-20.
- MAYOR M.L., NESTARES G., ZORZOLI R., PICARDI L.A. 2003. Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 99- 103.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- NAIRN B., FURNEAUX R., STEVENSON T. 1995. Identification of an agar constituent responsible for hydric control in micropropagation of radiata pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43: 1-11.
- SANCHEZ DE LORENZO J.M. 2003. Las Dracaenas.
<http://www.arbolesornamentales.com/Dracenas.htm>
- VINTERHALTER D., GRUBISIC D., VINTERHALTER B., KONJEVIC R. 1990. Light-controlled root elongation in *in vitro* cultures of *Dracaena fragrans* Ker-Gawl. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 22: 1-6.
- VINTERHALTER D., VINTERHALTER B. 1992. Effect of inorganic nutrition on the formation of lateral roots in *Dracaena fragrans* Ker-Gawl cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28: 267-274.
- WHITEHOUSE A., MARKS T., EDWARDS G. 2002. Control of hyperhydricity in *Eucalyptus* axillary shoot cultures grown in liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71: 245- 252.
- YADAV M., GAUR A.K., GARG, G.K. 2003. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 153- 156.
- ZIV M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. *In*: Micropropagation. Technology and application. Kluwer. Netherlands. 484 p.

