

Organogénesis adventicia en tejidos cotiledonares de melón

SILVIA A. RUIZ NÚÑEZ*

LEIDY Y. RACHE CARDENAL**

JOSÉ C. PACHECO MALDONADO***

* Bióloga, Auxiliar de Investigación Laboratorio BIOPLASMA-UPTC silvia20@hotmail.com

** Bióloga, Auxiliar de Investigación Laboratorio BIOPLASMA-UPTC leidyache@yahoo.com

*** Profesor Titular Escuela de Ciencias Biológicas UPTC. Director Laboratorio BIOPLASMA-UPTC. jocpach@hotmail.com

Resumen

Los cotiledones de melón son explantes potencialmente utilizables para el desarrollo *in vitro* de procesos organogénicos con fines de regeneración de plántulas a través de dos rutas: organogénesis directa e indirecta. En este ensayo se cultivaron, con iluminación y en obscuridad, segmentos cotiledonares basales medios y apicales para determinar sus capacidades morfogenéticas. Los resultados cuantificados indicaron que los segmentos cotiledonares basales, cultivados en medio MS suplementado 1.0 mg/L BA, son los explantes que expresan en mayor grado sus capacidades organogénicas canalizadas hacia la regeneración de plántulas a través de rutas organogénicas indirectas. En los cultivos de segmentos cotiledonares basales se cuantificaron los mayores porcentajes (30%) de explantes que formaron yemas y de explantes que desarrollaron microtallos (9%). La cuantificación de resultados también mostró que los explantes cultivados durante los primeros 15 días en condiciones de obscuridad, presentaron el mayor porcentaje (54%) de explantes que formaron yemas y el mayor número (261) de yemas neoformadas.

Abstract

Melon cotyledons are potentially explants usable for *in vitro* development of organogenic processes to regenerating plantlets through two routes: direct and indirect organogenesis. To determine their morphogenetic capacities basal, middle and apical cotyledonary portions were cultured, under continuous illumination and darkness conditions. The quantified results indicated that the basal cotyledonary portions, cultured in MS supplemented with BA-1.0 mg/L were the explants that expressed highest capacities to plantlet regeneration through indirect organogenic processes. In cultures of basal cotyledonary portions were quantified the highest percentages (30%) of explants that formed buds and explants that developed microshoots (9%). The results also showed that the explants cultured during the first 15 days under darkness conditions, presented the highest percentage (54%) of explants that formed buds and the highest number (261) of newformed buds.

Palabras clave: Cotiledones, morfogénesis, regeneración, *Cucumis melo*, micropropagación.

Key words: Cotyledons, morphogenesis, regeneration, *Cucumis melo*, micropropagation.

Introducción

El melón (*Cucumis melo* L.) es una especie ampliamente cultivada en el mundo, en la que se han venido realizando progresos en el mejoramiento de muchos caracteres, especialmente resistencia a enfermedades, virus e insectos. Esta especie forma parte de la familia de las *Cucurbitaceae* y del género *Cucumis* que comprende alrededor de 38 especies conocidas. Es una planta anual, monoica, herbácea, de porte rastrero o trepador y puede ser autofecundada; sin embargo, las fecundaciones cruzadas son predominantes. La polinización artificial es menos eficaz que la polinización por insectos debido a que las flores son muy pequeñas; además, el 80% de las flores hembras abortan naturalmente.

El método de propagación más utilizado para obtener plantas de melón es la propagación por semilla sexual, mediante utilización de semillero y posterior trasplante 6-7 semanas después de iniciado el cultivo, cuando las plantas presenten al menos la primera hoja verdadera bien desarrollada. En los últimos años, para establecimiento de plantaciones comerciales, se han utilizado variedades híbridas de mayor rendimiento y se han mejorado las condiciones de cultivo con miras a mantener altos niveles de producción.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una herramienta biotecnológica que permite estudiar el crecimiento de células vegetales, tejidos u órganos aislados de una planta madre y cultivados en medio artificial (George, 1993/1996). El cultivo *in vitro* consiste en el establecimiento

de cultivos asépticos de células, tejidos y órganos, en condiciones físicas y químicas definidas que permiten la manipulación de su crecimiento y desarrollo (Lindsey y Jones, 1989). Por tanto, el cultivo *in vitro* es una de las herramientas más adecuadas para el desarrollo de estudios básicos y aplicados en el campo de la biotecnología vegetal, así como para la explotación comercial de sus productos (Torpe, 1990).

Como consecuencia de las condiciones hormonales y nutritivas que se establecen de forma transitoria o permanente en los cultivos, las células vegetales pueden activar procesos metabólicos y fisiológicos diferentes a los que realizan cuando están formando parte de los tejidos de la planta. En virtud de las características de totipotencialidad y plasticidad del desarrollo que muestran las células vegetales, aún en estados plenamente diferenciados, es posible dirigir (manipular) el rumbo del desarrollo celular. Dicha manipulación se puede lograr realizando modificaciones experimentales específicas en la composición de los medios de cultivo. Las células en cultivo absorben sustancias y liberan metabolitos; este intercambio continuo de sustancias modifica la composición del medio lo cual afecta los procesos de división celular y los procesos de síntesis (Lindsey and Jones, 1989).

La morfogénesis hace referencia a la creación de nuevas formas de organización donde no existían; nuevos órganos, como brotes y raíces, pueden ser inducidos a través de cultivo de tejidos vegetales. Los tejidos u órganos que muestran capacidad para expresar morfogénesis/organogénesis son llamados morfogénicos (morfogenéticos) u organogénicos (organogenéticos). En forma casi rutinaria,

en numerosas especies ya es posible manipular el desarrollo adventicio de: brotes (caulogénesis), raíces (rizogénesis) y embrioides que son estructuralmente semejantes a los embriones zigóticos.

La caulogénesis, rizogénesis y embriogénesis son procesos importantes para la multiplicación vegetal. La regeneración de plantas completas, a partir de células individuales puede ser adecuadamente realizada mediante la obtención de brotes adventicios, en los cuales se induce formación de raíces. Los brotes, raíces y embriones somáticos se pueden formar a partir de células simples (únicas), que presentan tanto el potencial genético para regenerar una planta completa, como la capacidad para realizar todas las funciones de desarrollo características del cigoto (totipotencia); o se pueden formar a partir de grupos de células que pueden ser inducidas (por condiciones específicas de cultivo) a formar nuevos centros activos de división celular (meristemas morfogenéticos), cada uno capaz de producir un órgano (George, 1993/1996).

Las células competentes son aquellas que han conservado la capacidad de diferenciación (formación de nuevos órganos) o que la han adquirido en respuesta a un estímulo apropiado (George, 1993/1996). En cultivos *in vitro* los tejidos llegan a ser competentes y completamente determinados para la producción de primordios durante la etapa de inducción. Durante esta etapa, además, es posible la canalización de tejidos, que es la propiedad que poseen las vías de desarrollo para producir un fenotipo estándar a pesar de las variaciones ambientales o genéticas, mediante la cual se puede describir y cuantificar el compromiso de desarrollo que el tejido ha alcanzado hacia un punto particular de terminación (por ejemplo, formación de yemas).

Los principales métodos para regenerar y multiplicar plántulas *in vitro* son: cultivo de brotes, cultivo de segmentos nodales, embriogénesis somática y organogénesis (producción de brotes adventicios).

La organogénesis es un proceso de desarrollo que en muchos aspectos es único en las plantas. Las células vegetales retienen la capacidad para dediferenciarse desde su estado estructural y funcional corriente y comenzar una nueva vía de desarrollo hacia otros estados morfogenéticos. Dependiendo de la presencia o ausencia de un estado intermedio de callo, entre los tejidos del explante original y las estructuras formadas *de novo*, experimentalmente se pueden inducir dos rutas organogénicas: organogénesis indirecta, en la cual el tejido callogénico sirve como punto de iniciación de organogénesis *de novo* y, organogénesis directa en la cual no se presenta un estado intermedio de callo y las células del explante tienen la capacidad para actuar como precursores directos de los nuevos primordios.

El proceso organogénico puede dividirse en 3 etapas principales:

- Periodo de inducción, definido como el proceso por el cual una señal de desarrollo actúa en células competentes para alterar la vía de desarrollo (McDaniel *et al.*, 1992); comienza con la iniciación de los cultivos, periodo durante el cual se realizan todos los cambios celulares que imponen una alta actividad mitótica, que da como resultado una proliferación celular localizada en las capas más superficiales de los tejidos cultivados, constituyéndose así los loci de iniciación caulogénica.
- Periodo de iniciación-manifestación de primordios, durante el cual tiene lugar la organización de los meristemoides y la profusión de los primeros primordios caulinares.
- Periodo de desarrollo, a través del cual predomina la elongación caulinar, observándose la formación de verdaderos microtallos (Pacheco, 1995).

Con base en los estudios realizados por Compton y Gray (1993) y Srivastava *et al.*, (1989), se puede establecer un sistema eficaz

de regeneración de plantas utilizando cotiledones de plántulas de melón como fuente de explantes primarios. A partir de estos explantes se pueden obtener microtallos adventicios a través de procesos organogénicos; los microtallos pueden ser enraizados para regenerar plantas completas en un periodo de 8 a 10 semanas desde la iniciación de los cultivos.

En el melón, las mejores fuentes de explantes son los cotiledones de plántulas germinadas *in vitro*. Sin embargo, no todas las regiones de un cotiledón poseen el mismo potencial de regeneración; por tanto, el objetivo de este trabajo es determinar la capacidad que poseen diferentes regiones cotiledonares (segmentos apical, medio y basal) para desarrollar procesos caulogénicos, así como determinar la influencia de la presencia o ausencia de luz como estímulo para la formación de yemas adventicias.

Metodología

1. Germinación *in vitro* de semillas

Semillas obtenidas de frutos maduros de melón fueron colocadas en imbibición en agua destilada durante 12 horas, a temperatura ambiente. Posteriormente, para remover intacto el embrión, se eliminó la cubierta seminal realizando varios cortes en la periferia de la semilla. Los embriones fueron colectados en agua destilada.

Los embriones fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 25% (v/v) más Tween 20 (0.1 ml/100 ml), durante 25 minutos con agitación constante; luego se enjuagaron 4 veces consecutivas con agua destilada estéril. Este procedimiento de asepsia superficial se realizó en cámara de flujo laminar.

Los embriones fueron cultivados individualmente en recipientes con medio de germinación, MS, (Murashige y Skoog, 1962) al cual se adicionó 30 g/L de sacarosa. Los cultivos fueron incubados en cuarto de crecimiento a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, con luz continua durante 10 días.

2. Formación de yemas y desarrollo de microtallos

A cada plántula germinada se le realizó un corte ligeramente por encima de la inserción del hipocótilo; los cotiledones se separaron y se desechó el ápice caulinar. Mediante dos cortes transversales, de cada cotiledón se obtuvieron tres explantes (basal, medio y apical) los cuales se cultivaron con la cara abaxial en contacto con la superficie del medio. Los explantes se cultivaron en medio de inducción (MS más 30 g/L de sacarosa y 1 mg/L de BA). Los cultivos fueron incubados en cuarto de crecimiento. La mitad de los explantes se mantuvieron en oscuridad durante 15 días y luego se incubaron con luz continua.

La cuantificación de yemas formadas se realizó después de cuatro semanas de cultivo, teniendo en cuenta el número de explantes de cada región cotiledonar que formó y desarrolló yemas y/o microtallos.

3. Elongación y enraizamiento de microtallos y endurecimiento de plántulas

Los microtallos obtenidos en la etapa anterior fueron transferidos a recipientes con medio de elongación (MS más 30 g/L de sacarosa) e incubados en cuarto de crecimiento durante cuatro semanas. Los microtallos que alcanzaron más de 20 mm de longitud se escindieron y transfirieron a recipientes con medio de enraizamiento (MS más 20 g/L de sacarosa y 0.2 mg/L de AIB) y se incubaron en cuarto de crecimiento durante 30 días.

Las plántulas regeneradas se removieron de los recipientes de cultivo y se les eliminó el agar adherido a las raíces mediante un enjuague con agua corriente. Las plántulas fueron transferidas a un sustrato compuesto por tierra, arena y cascarilla (2:1:1) y se ubicaron en módulos cerrados en invernadero. La aclimatización de las plántulas se realizó mediante disminución gradual de la humedad relativa durante 1 a 2 semanas; el riego se realizó por nebulización y

la intensidad luminosa se aumentó progresivamente.

Resultados y discusiones

Germinación de semillas

Las condiciones físicas y el medio de cultivo utilizado permitieron la germinación del 100% de las semillas. El proceso de germinación de semillas no es sincrónico; algunas desarrollaron plántulas después de siete días de cultivo y las demás completaron su desarrollo después de 15 días. La germinación se inicia con el desarrollo radicular y síntesis de clorofila en los cotiledones. La síntesis de clorofila comienza en la región basal y progresa en dirección al ápice cotiledonar. La recuperación del 100% de plántulas asépticas puso en evidencia tanto la eficacia del procedimiento de asepsia superficial, como la ausencia de contaminantes endógenos en las semillas.

Formación de yemas y desarrollo de microtallos

Los resultados registrados después de 30 días de cultivo en medio de inducción, mostraron que un 54% de los explantes estimulados durante 15 días en oscuridad expresaron capacidad para formar, en promedio, 4 yemas por explante. Mientras que solo el 33% de explantes

estimulados en condiciones de luz continua formaron en promedio 2 yemas por explante. Además, el mayor número de yemas formadas (261, tabla 1) también se obtuvo en explantes estimulados en condiciones de oscuridad. La variación en las respuestas organogénicas cuantificadas en condiciones de luz continua y oscuridad se puede atribuir, en parte, a que la presencia de luz provoca la inhibición del proceso de síntesis natural de citoquininas; estos reguladores son necesarios para la reorganización celular conducente a neoformación de estructuras. Además, se sabe que la presencia de luz estimula la producción de ácido abscísico, el cual actúa como antagonista de las citoquininas (George, 1993/1996).

La presencia de luz durante la etapa de inducción promovió la formación de callo no organogénico en un mayor porcentaje de explantes (67%); mientras que el mayor porcentaje de explantes (31%) que formaron callo organogénico se cuantificó en los explantes estimulados en oscuridad. Este resultado indica que la presencia de luz inhibe la formación de callo organogénico y, por ende, la inducción y formación de yemas; dicha inhibición puede estar relacionada, según George (1993/1996), con la presencia de compuestos fenólicos, cuya producción está influenciada por la acción de la luz en los tejidos, los cuales actúan como inhibidores de crecimiento.

Tabla 1

Efecto de la estimulación de explantes cotiledonares, con BA en presencia o ausencia de luz, sobre la formación de yemas

	EC	ECYF		YF		ECNO		ECO
		No.	%	No.	X	No.	%	%
Luz	57	19	33	116	2.0	38	67	18
Oscuridad	74	40	54	261	4.0	34	46	31

EC: Explantes cultivados; ECYF: Explantes con yemas formadas; YF: Yemas formadas; ECNO: Explantes con callo no organogénico; ECO: Explantes con callo organogénico.

continua
explan-
te. forma-
uvo en
de obs-
puestas
iones de
atribuir,
ovoca la
atural de
ecesarios
ucente a
, se sabe
roducción
o antago-
93/1996).
de induc-
callo no
ntaje de
ayor por-
aron callo
lantes es-
do indica
nación de
ducción y
ón puede
993/1996),
icos, cuya
acción de
ían como

Los explantes cotiledonares basales, con relación a los explantes medios y apicales, expresaron mayor capacidad de neoformación de yemas, registrándose un 30% de explantes con un total de 28 yemas formadas a través de procesos organogénicos directos, y 30% de explantes con un total de 171 yemas formadas a través de procesos organogénicos indirectos.

De la misma manera, los explantes cotiledonares basales expresaron mayor capacidad caulogénica que los explantes medios y apicales; cuantificándose 9% de explantes con un total de 30 microtallos desarrollados a través de procesos organogénicos indirectos. En segmentos apicales se cuantificaron los menores porcentajes de explantes con yemas formadas (15 y 20%, para organogénesis directa e indirecta, respectivamente) y los menores porcentajes de explantes medios y apicales con microtallos desarrollados (2% para organogénesis directa y 0% para indirecta; tabla 2). Las diferencias entre las respuestas organogénicas de las porciones cotiledonares basales y apicales pueden deberse, en parte, a

los diferentes grados de competencia, maduración y estado fisiológico que pueden presentar los explantes, aún perteneciendo a una misma estructura (Ellis and Bilderback, 1989).

Las respuestas organogénicas cuantificadas en los tres tipos de explantes pusieron en evidencia que a través de la ruta organogénica indirecta se formó mayor cantidad de yemas (292) y de microtallos (30), en comparación con la ruta organogénica indirecta, 85 yemas formadas y 7 microtallos desarrollados. Estas observaciones indican que las células de los diferentes segmentos cotiledonares cultivados, presentan variación en el estado de determinación; por tanto, requieren diferentes niveles de estimulación para alcanzar ciertos estados de dediferenciación en los cuales las células están menos determinadas y pueden adquirir nuevas competencias morfogénicas. Estas nuevas competencias controlan y dirigen procesos de rediferenciación morfológica, las cuales se expresan mediante desarrollo de tallos y raíces (órganos funcionales), y posterior regeneración de plantas completas.

Tabla 2
Influencia de la posición del segmento cotiledonar sobre la neoformación de yemas y desarrollo de microtallos

SC	EC	ECYF				ECM				YF		Microtallos	
		OD	%	OI	%	OD	%	OI	%	OD	OI	OD	OI
Apical	39	6	15	8	20	2	5	0	0	32	71	2	0
Medio	45	6	13	11	24	2	4	0	0	25	50	5	0
Basal	47	14	30	14	30	0	0	4	9	28	171	0	30
Total	131	26		33		4		4		85	292	7	30

SC: Segmento cotiledonar; EC: Explantes cultivados; ECYF: Explantes con yemas formadas; ECM: Explantes con microtallos; YF: Yemas formadas; OD: Organogénesis directa; OI: Organogénesis indirecta.

En este trabajo, la estimulación de explantes cotiledonares con 1 mg/L de BA demostró ser efectiva para inducir neoformación de yemas concordando con los resultados reportados por Yutaka *et al.*, (1998), Dirks y Buggenum, (1989), Kathal, *et al.*, (1988), Tabei *et al.*, (1991), quienes cuantificaron la mayor cantidad de yemas formadas en cultivos realizados en presencia de BA durante la etapa de inducción.

En los procesos de organogénesis indirecta, la dediferenciación celular se presenta como consecuencia de una división celular intensa que conlleva la formación de callo, seguida de

una etapa de inducción durante la cual el explante adquiere competencia para formación de primordios; finalmente, los primordios originan yemas adventicias que desarrollan microtallos (figura 1 A-E).

En organogénesis directa las células del explante poseen la competencia necesaria para formación de meristemoides, producción de nuevos primordios y regeneración de órganos (figura 2 A-E), lo cual se evidencia en la capacidad de respuesta del explante ante el estímulo con el regulador.

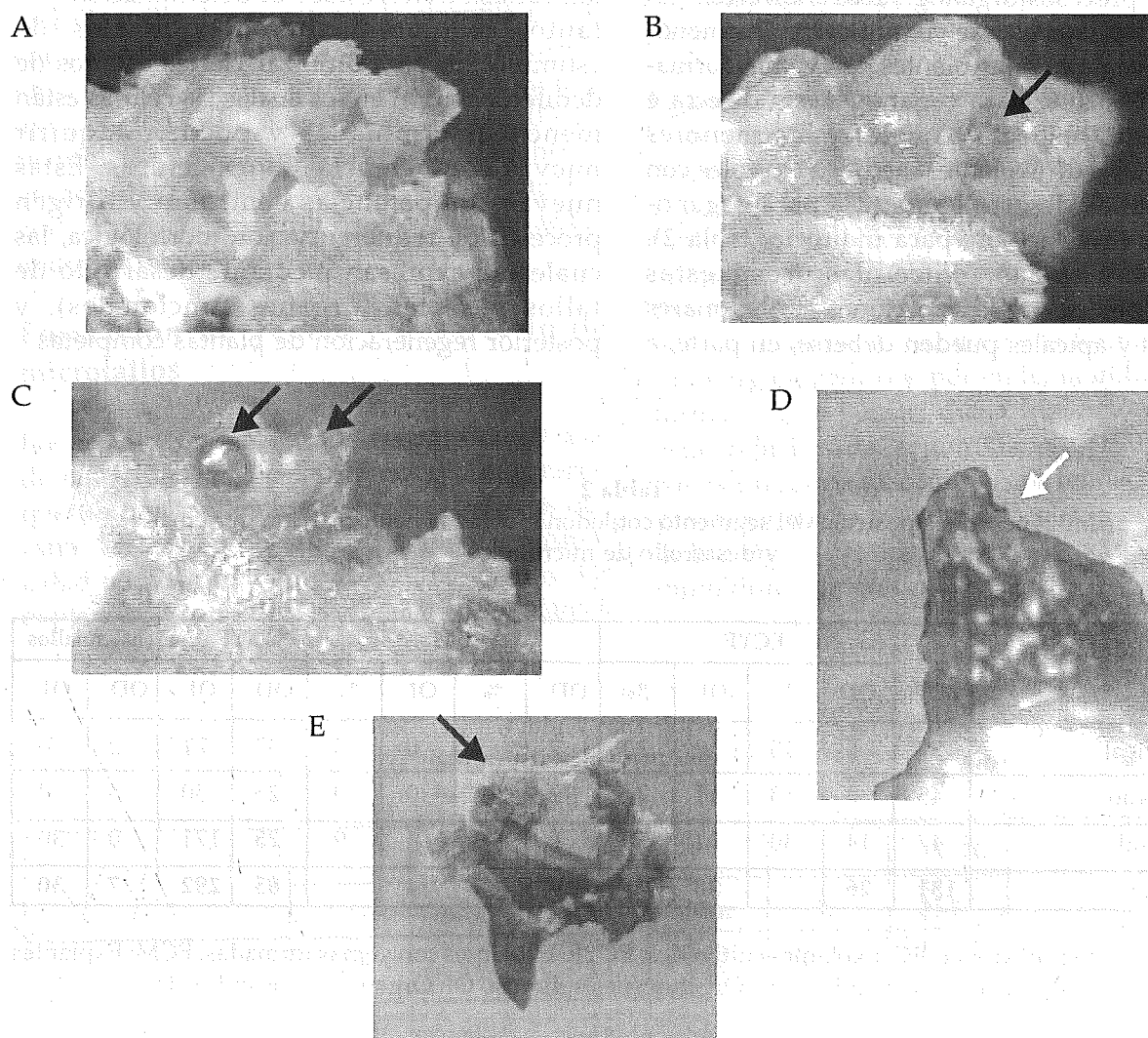


Figura 1

Organogénesis indirecta. A: Formación de callo. B: Meristemoides en formación. C y D: Yemas en desarrollo. E: Raíz adventicia desarrollada a partir de tejido callogénico.

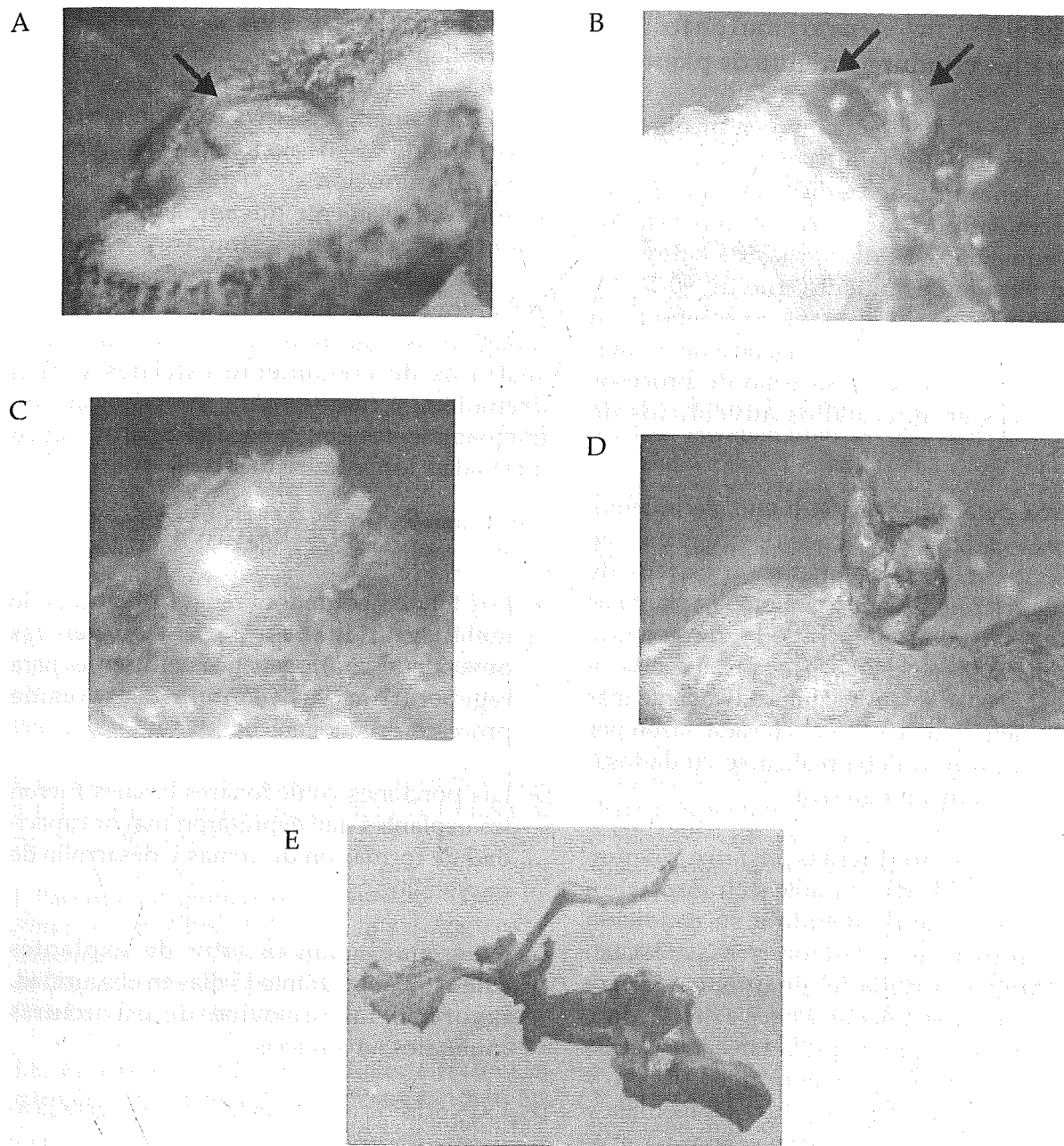


Figura 2

Organogénesis directa. A: Meristemoides en formación. B: Primordios en formación. C y D: Yemas en desarrollo. E: Microtallo desarrollado.

Elongación y enraizamiento de microtallos y endurecimiento de plántulas

Después de 30 días de cultivo en medio para elongación, los microtallos elongaron alcanzando una longitud adecuada (20-30 mm) para enraizamiento. El porcentaje de microtallos enraizados, después de 30 días de cultivo en medio para enraizamiento, fue de 90-100%; este resultado indica que tanto la composición básica del medio, como la presencia de 0.2 mg/L de AIB facilitan el desarrollo de procesos rizogénicos en microtallos adventicios de melón.

La etapa de aclimatización o endurecimiento, realizada en las condiciones descritas en este trabajo, permitió la recuperación de 85% de plántulas viables. El endurecimiento de plántulas es un proceso que comprende la transferencia de las plántulas regeneradas *in vitro*, a condiciones de humedad relativa significativamente más bajas e intensidad de luz más elevada; razón por la cual el proceso debe realizarse cuidadosamente y de forma progresiva.

Las plántulas producidas *in vitro* pueden presentar dificultades durante su trasplante a condiciones *ex vitro*, debido a su condición heterotrófica de nutrición y a su escaso autocontrol de pérdida de agua; por tanto, para que las plántulas puedan llegar a ser viables, necesitan realizar una rápida transición del estado heterotrófico al fotoautotrófico (Preece y Sutter, 1991). Esta transición no es inmediata y ocurre solo después de la formación y desarrollo de nuevas hojas, porque las hojas desarro-

lladas *in vitro* en presencia de sacarosa nunca desarrollan plena competencia fotosintética. Además, las condiciones de cultivo *in vitro* bajo 100% de humedad relativa, contribuyen a un desarreglo de rasgos anatómicos y fisiológicos como disminución de la cera epicuticular, mesófilo escasamente diferenciado, funcionamiento anormal de estomas y conexión vascular escasa entre el tallo y las raíces. Sin embargo, estas limitaciones pueden ser superadas si las plántulas son transplantadas a sustratos de crecimiento estériles y bien drenados, y mantenidas inicialmente en microambientes con humedad relativa alta e intensidad lumínica reducida.

Conclusiones

- Los tejidos cotiledonares de plántulas de melón germinadas *in vitro* poseen las capacidades morfogénicas suficientes para regenerar nuevas plántulas a través de procesos organogénicos.
- Las porciones cotiledonares basales fueron los explantes que expresaron mayor capacidad de formación de yemas y desarrollo de microtallos.
- La estimulación *in vitro* de explantes cotiledonares durante 15 días en obscuridad, favoreció la formación de estructuras caulinares adventicias.
- La expresión de capacidades morfogénicas fueron observadas con mayor frecuencia a través de procesos organogénicos indirectos.

Bibliografía

- C.N. McDaniel, S.R. Singer and S.M.E. Smith. Developmental status associated with the floral transition. *Dev. Biol.* 53: 59-69 (1992).
- D.D. Ellis and D.E. Bilderback. Temporal competence of embryonic *Pinus ponderosa* cotyledons to form multiple buds *in vitro*. *Amer. J. Bot.*, 76: 348-355 (1989).
- D.R. Srivastava, V.M. Andrianov and E.S. Piruzian. Tissue culture and plant regeneration of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad. Cv. Melitopolski). *Plant Cell Rep.*, 8:300-302 (1989).
- E. George. Plant Propagation by tissue culture. Part 2. In Practice. Exegetics Limited, (Ed.), 2ed, England. pp. 575-1361 (1993/1996).
- J. Pacheco. Revigorización de material adulto de *Pinus nigra* ARN: Criterios morfológicos y moleculares. Ph.D. Thesis. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo, Oviedo-España. 244p (1995).
- J.E. Preece and E.G. Sutter. Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field. En: Micropropagation Technology and Application. P.C. Debergh, y R.H. Zimmerman, (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 71-93 (1991).
- K. Lindsey y M.G.K. Jones. Biotecnología vegetal agrícola. 276 p (1989).
- M.E. Compton, D.J. Gray. Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid, and tetraploid watermelon. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118:151-157 (1993).
- R. Dirks and M.V. Buggenum. In vitro plant regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo* L. *Plant Cell Rep.*, 7, 626-627 (1989).
- R. Kathal, S.P. Bhatnagar and S.S. Bhojwani. Regeneration of plants from leaf explants of *Cucumis melo* cv. Pusa sharbati. *Plant Cell Rep.*, 9, 449-451 (1988).
- T. Yutaka, Y. Tomohiro, M. Toshikazu and O. Takeshi. Plant regeneration via shoot organogenesis from cotyledons in two wild *Cucumis* species, *C. figareii* and *C. metuliferus*. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 32: 4 (1998).
- T.A. Torpe. The current status of plant tissue cultura. En: Bhojwani (ed), *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*. Elsevier Science Publ., Amsterdam. pp. 1-33 (1990).
- Y. Tabei, T. Kanno and T. Nishio. Regulation of organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon, *Cucumis melo* L. *Plant Cell Rep.*, 10, 225-229 (1991).
- www.infoagro.com
- www.kokopelli-seed-foundation.com