

ORGANOGENESIS *in vitro* EN TEJIDOS DE TALLO DE *Agave marmorata* Y *Agave angustifolia*¹

[*In vitro* ORGANOGENESIS ON STEM TISSUES OF *Agave marmorata* AND *Agave angustifolia*]

Lizbeth López Acevedo¹, Yaneth Elisea Merino Pérez¹, José Raymundo Enríquez del Valle^{1§}, Gerardo Rodríguez-Ortiz¹, Zoila Carmen Lagunas Sánchez¹

¹TecNM/Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Ex hacienda de Nazareno, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. C.P. 71230. [§]Autor para correspondencia: (jenriquezdelvalle@yahoo.com).

RESUMEN

El aprovechamiento sin planes de manejo de especies silvestres, como el *Agave marmorata* se ha intensificado, por lo que sus poblaciones están disminuyendo, y los campesinos están interesados en implementar su propagación y cultivo. De la especie cultivada *A. angustifolia*, interesa incrementar el área de plantaciones, por lo que se requiere aumentar la producción de plantas de calidad. Se propuso realizar la micropropagación de las especies de agaves citadas, en complemento a los métodos de propagación convencionales. Por lo que el presente trabajo tuvo el objetivo de establecer cultivos asépticos e inducir la organogénesis en tejidos de tallo. Plantas de *A. marmorata* y *A. angustifolia* de 1 a 2 años de edad se colectaron en campo y se les estableció durante tres meses en vivero para someterlas a tratamientos con fungicidas, antibióticos y fertilización, para mejorar su condición sanitaria y vigor. A partir de 20 plantas de *A. angustifolia* se obtuvieron 586 explantes de tejido de tallo que se establecieron *in vitro*, en un medio de cultivo para inducir la organogénesis. Transcurridos tres meses 202 explantes (34.47%) resultaron asépticos, viables, con inicios de respuesta de organogénesis. De los cuales, en sólo cuatro explantes ocurrió la formación de brotes adventicios. A partir de 15 plantas de *A. marmorata*, se obtuvieron 228 explantes de tejidos de tallo que se establecieron *in vitro*. Transcurridos tres meses 68 explantes (29.82%) resultaron asépticos, viables, con inicios de respuesta de organogénesis, ocho de éstos presentaron formación de brotes adventicios.

Palabras clave: Cultivo de células vegetales, micropropagación, propagación asexual.

ABSTRACT

The use of wild species without management plans, such as the *Agave marmorata* has intensified and so their populations are decreasing, and peasants are interested in implement the propagation and cultivation of this agave, while they are interested for increase the cultivation area of *A. angustifolia*, then it is necessary to increase the production of quality plants. It was proposed to micropropagate the agave species mentioned, in addition to conventional propagation methods. Therefore, the objective of this work was to establish aseptic cultures of stem tissues and induce organogenesis in this tissue. Plants of *A. marmorata* and *A. angustifolia* from 1 to 2 years old were collected in the field and established for three months in nursery to submit them to treatments with fungicides, antibiotics and fertilization, to improve their sanitary condition and vigor. From 20 plants of *A. angustifolia*, and 15 plants of *A. marmorata* a 586 and 228 stem tissue explants were

¹ Recibido: 12 de noviembre de 2018.
Aceptado: 10 de diciembre de 2018.

obtained respectively, that were established *in vitro* in a culture medium to induce organogenesis. After three months 202 explants (34.47%) and 68 explants (29.82%) were aseptic, viable with early organogenesis response. In which, only eight explants, had adventitious shoots, respectively.

Index words: Plant cell culture, micropropagation, asexual propagation.

INTRODUCCIÓN

En México se tiene un total de 150 especies de Agave, de las cuales en el estado de Oaxaca se encuentran 120 especies y subespecies derivadas, y varias de éstas se usan para la producción de mezcal, producto que cuenta con denominación de origen y de importancia económica en la referida “región del mezcal” que abarca los distritos de Yautepec, Ejutla, Miahuatlán, Ocotlán, Sola de Vega, Zimatlán y Tlacolula, aunque también hay producción en la región Mixteca. En la denominación de origen también se incluyen los estados de Guerrero, Durango, San Luis Potosí, Zacatecas, Guanajuato y Michoacán (Martínez *et al.*, 2013). En Oaxaca, durante el año 2007 se contabilizaron casi 14 mil productores de maguey y mezcal, y para el año 2015 se tenían 18 mil ha cultivadas de maguey con aproximadamente 28 millones de plantas. En cuanto a la cantidad de producto para venta internacional, Oaxaca ocupa el primer lugar del total de mezcal exportado, 90.2% (Palma *et al.*, 2016).

Las especies de agave cultivadas en mayor extensión, *A. tequilana*, *A. fourcroydes*, *A. salmiana* y *A. angustifolia*, se propagan asexualmente. En las especies citadas, la reproducción sexual se ha aplicado de manera limitada y también son escasos los antecedentes de mejoramiento de las especies cultivadas. Una alternativa prometedora para superar las limitaciones de producir grandes cantidades de plantas de calidad en estas especies, es aplicar las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, para la micro propagación o *in vitro* (Domínguez-Rosales, 2008).

Enríquez-del Valle (2008) describe que la propagación clonal de plantas mediante la técnica de cultivo de células, tejidos u órganos, se basa en el principio de que toda célula vegetal tiene la información genética para regenerar un organismo completo, lo que se conoce como totipotencia, y para que la célula pueda expresar este potencial es necesario que se le proporcionen las condiciones ambientales adecuadas, usando principalmente medios nutritivos de composición definida, en recipientes de material transparente, generalmente vidrio, pero también plástico. También se requieren condiciones asépticas en todas las etapas de propagación. Los factores que influyen en la respuesta de los cultivos *in vitro* han sido incluidos en dos grupos 1) composición química del medio de cultivo en la que se incluyen el agua, las sales inorgánicas tanto macronutrientes como micronutrientes, los compuestos orgánicos como carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento, complejos orgánicos y sustancias de soporte físico; 2) Las condiciones físicas de incubación: la temperatura, la iluminación, humedad relativa y gases atmosféricos.

El maguey tepextate (*A. marmorata*) es una especie silvestre que crece en lomeríos y vegetación de selva baja caducifolia, en el estado de Puebla y en los Valles Centrales y Sierra Sur del estado de Oaxaca, México. Se le usa como materia prima para la elaboración de la bebida destilada denominada mezcal, pero debido a que su colecta se realiza sin planes de manejo, sus poblaciones están disminuyendo (Jiménez-Valdés *et al.*, 2010). En el caso del maguey espadín (*A. angustifolia*), es la especie cultivada que ocupa el 70% del área total de área de plantaciones de agaves mezcaleros

en Oaxaca. Según Ríos-Ramírez *et al.* (2018), anualmente se requiere producir 2.6 millones de plantas para establecer nuevas plantaciones que repongan la cantidad de plantas que se cosechan anualmente y para aumentar el inventario de cultivos, por lo que existe una demanda alta de plantas. Las plantaciones de maguey espadín se establecen con plantas obtenidas asexualmente, principalmente mediante vástagos de rizoma y bulbilos de inflorescencia, pero desde 1987 se tiene la experiencia de que una cantidad menor de 0.5% han sido plantas obtenidas mediante cultivo de tejidos vegetales (Enríquez -del Valle, 2008). Por lo que, la propagación de agaves mediante cultivos de tejidos se ha propuesto como una alternativa complementaria a los métodos de propagación convencional.

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas para la regeneración y propagación asexual de especies vegetales que requiere ambientes asépticos y condiciones controladas de medios de cultivo e incubación. Las técnicas de propagación vegetal mediante cultivos *in vitro* iniciaron su aplicación comercial desde la década de 1970; principalmente en especies ornamentales de valor económico alto, de manera gradual su aplicación se extendió a especies frutales como el plátano (Uma *et al.*, 2010), y forestales como *Eucalyptus globulus* (Rodrigues- Borges *et al.*, 2012). Sin embargo, en algunas regiones del mundo y en diversos sistemas productivos, estas técnicas se podrían considerar como innovación tecnológica. Tal es el caso de especies de agave cultivadas y silvestres cuya conservación no es posible en las condiciones en que se les aprovecha actualmente (Domínguez *et al.*, 2008).

Se tienen antecedentes de propagación *in vitro* de diversas especies de agave, entre las que se encuentran *A. fourcroydes* (Robert *et al.*, 1987), *A. tequilana* (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006; Portillo *et al.*, 2007), *A. sisalana* (Das, 1992; Nikam, 1997; Hazra *et al.*, 2002; Nikam *et al.*, 2003) y *A. angustifolia* (Enríquez-del Valle *et al.*, 2005; Enríquez-del Valle, 2008), en las que se han determinado condiciones de medios de cultivo y ambiente de incubación para diversas etapas del procedimiento de propagación: establecimiento de cultivos asépticos, multiplicación de propágulos, enraizado de brotes en preparación para trasplante a suelo, transferencia de las plantas a macetas con sustrato para aclimatización en invernadero, entre otras.

No se tienen referencias de la propagación *in vitro* de la especie silvestre *A. marmorata*, sin embargo, se tomó como base el procedimiento para establecimiento de cultivos asépticos *in vitro* e inducción de morfogénesis en tejidos de tallo de *A. angustifolia*, descrito por Ríos-Ramírez *et al.* (2018), por lo que en el presente trabajo se estableció el objetivo de establecer cultivos asépticos e inducir la respuesta morfogénica en tejidos de tallo de *A. marmorata* y *A. angustifolia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el invernadero y el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, ubicado en la Ex –Hacienda de Nazareno, Municipio de Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca. Las plantas de agaves se colectaron en el mes de agosto de 2017 en terrenos de la localidad de Santiago Matatlán, Tlacolula, Oaxaca. Se seleccionaron plantas con hojas de 47 a 58 cm de largo, se podaron sus raíces hasta 10 a 15 cm de longitud y se establecieron en macetas de polietileno negro de 25 cm de diámetro, 25 cm de altura, con 12 dm³ de suelo de textura franco arcillosa. Las plantas en macetas se establecieron en un vivero tipo casa sombra de 7.5 m de ancho, 12.5 m de longitud, 3.5 m de altura, de estructura metálica y cubierta de polietileno traslúcido, las camas de 1.3 m de ancho de longitud, delimitadas en toda su periferia

por un muro de concreto de 10 cm de altura, los pasillos de 40 cm de ancho con piso de concreto. En estas condiciones las plantas se sometieron durante 90 días a un régimen de aplicación dos veces a la semana 0.5 g L^{-1} de fungicida sistémico de nombre comercial Captan (Ingrediente activo N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1-2-dicarboximida 50.00%); 0.5 g L^{-1} de terramicina agrícola (clorhidrato de oxitetraclina) una vez a la semana y fertirriego, una vez a la semana, con solución nutritiva de la formulación universal de Steiner (1984). Cuando transcurrió el periodo indicado, se cosecharon plantas de *A. angustifolia* en siete fechas y plantas de *A. marmorata* en cinco fechas. El medio de cultivo que se usó para establecer los cultivos asépticos e inducir la morfogénesis en tejidos somáticos de agave, contenía: sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962), 1 mg L^{-1} de tiamina-HCl, 100 mg L^{-1} de myo-inositol, 30 g L^{-1} de sacarosa, 1 mg L^{-1} de N6-Bencilaminopurina, 0.3 mg L^{-1} de ácido indolacético. El pH se ajustó a 5.8 antes de agregar 5.7 g L^{-1} de agar. El agar se disolvió con calor y agitación y se distribuyeron 20 ml a cada frasco de cultivo de 145 cm^3 , y entonces el frasco se cerró con una tapa de polipropileno. Los frascos con medio de cultivo se esterilizaron durante 17 min en autoclave a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ y 1.2 kg cm^{-2} de presión. A las plantas se les eliminó la raíz, las hojas se cortaron hasta su base. Los tallos se sometieron a un proceso de desinfección superficial en una secuencia de las sustancias siguientes 1) lavado con una solución 0.2% detergente; 2) inmersión durante 20 minutos en una solución 0.6% de hipoclorito de sodio; 3) tres enjuagues con agua esterilizada. A partir del paso 2, el manejo del material vegetal se realizó en condiciones asépticas proporcionadas por una cámara de aire filtrado de flujo laminar horizontal; se usaron pinzas y bisturí esterilizados.

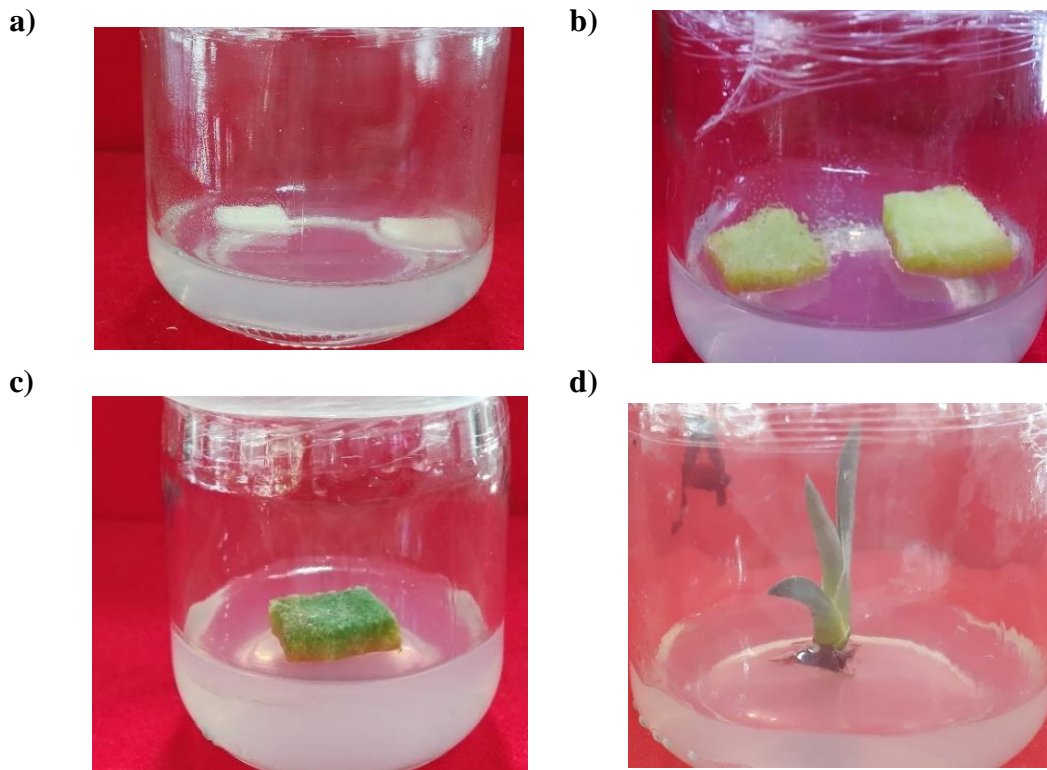
Para obtener los explantes cada tallo se colocó en una caja Petri de vidrio de 10 x 100 mm, esterilizada. Con las herramientas de disección esterilizadas mediante flama, se cortaron segmentos de tejido de tallo de $1.5 \times 1.5 \times 0.3 \text{ cm}$, para colocar dos segmentos en cada frasco de cultivo de 145 cm^3 que contenía 20 ml de medio de cultivo esterilizado y consistencia de gel. Se colocó nuevamente la tapa al frasco y se selló con polietileno adherente, entonces los cultivos se establecieron durante 70 días en un área de incubación, expuestos a iluminación proporcionada por lámparas LED $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, en fotoperiodos de 16 h y 8 h de oscuridad; temperatura en el rango de 15 a $29 \text{ }^\circ\text{C}$.

En el transcurso de los 70 días se evaluó la cantidad de fragmentos de tejidos de tallo que se obtuvieron de cada planta, el porcentaje de estos segmentos que se contaminaron, los que se conservaron asépticos-viables, y los que mostraban indicios de formación de brotes adventicios. Se describió la apariencia inicial y los cambios graduales que se observaron macroscópicamente en los fragmentos de tejido en que ocurrió la formación de brotes adventicios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fue posible inducir en tejidos de tallo de *A. marmorata* y *A. angustifolia* la organogénesis mediante la formación de brotes adventicios, similar a la descripción de la propagación de *A. fourcroydes* (Madrigal *et al.*, 1990) y *A. angustifolia* (Ríos-Ramírez *et al.*, 2018). A partir del establecimiento del cultivo aséptico, cada día durante el periodo de incubación se contabilizaron los explantes en que se observaron cambios de apariencia hasta llegar a una posible respuesta de organogénesis (Cuadro 1). En la Figura 1 se muestran los cambios que se observaron durante cultivo el *in vitro*. Al inicio del cultivo, los explantos de *Agave angustifolia* (Figura 1) y de *Agave marmorata* (Figura 2) tenían superficie lisa y coloración amarillo clara. A partir del tercer día de incubación se observó un ligero aumento de tamaño de los explantos y su superficie adquirió apariencia rugosa debido a

que estaban ocurriendo divisiones celulares. Transcurrida una semana los explantos adquirieron coloración verde y en el día 70 se observaron brotes. Lo sucedido es similar a lo observado por Ríos-Ramírez *et al.* (2018), quienes cultivaron *in vitro* tejidos de tallo de *Agave angustifolia* en los que se obtuvo la formación de brotes adventicios. Villalobos *et al.* (1985) y Thompson y Thorpe (1997) describieron que en los explantos de tejidos somáticos de *Pinus radiata* que se establecieron *in vitro* para promover la formación de brotes adventicios, el proceso de organogénesis se inició en células de tipo parénquima, algunas de éstas fueron inducidas a asumir divisiones celulares que dieron origen a grupos de células desdiferenciadas, que son pequeñas, con núcleos prominentes, paredes celulares delgadas y espacios intercelulares pequeños. En algunos de estos grupos de células continuaron las divisiones celulares para dar origen a estructuras celulares organizadas en centros meristemáticos denominados meristemoides, cuyas células poseían abundantes cloroplastos. En estos meristemoides continuaron las divisiones celulares para formar los meristemas y posteriormente los brotes adventicios.



Cuadro 1. Cultivos asépticos *in vitro* y respuesta de organogénesis en explantos de maguey espadín (*A. angustifolia*)

Fecha	CEE y (%)	CEC y (%)	CENV (%)	CEAAV (%)	CEAVPV (%)
20/10/17	36(100%)	24(66.6%)	4(11.11%)	5 (13.88%)	3(8.33%)
27/10/17	34(100%)	15(44.1%)	5(14.70%)	10(29.41%)	4(11.76%)
16/11/17	31(100%)	23(74.19%)	4(12.90%)	2(6.45%)	2(6.45%)
24/11/17	46(100%)	5(10.86%)	18(39.13%)	15(32.60%)	8(17.39%)
30/11/17	55(100%)	20(36.36%)	20(36.36%)	10(18.18%)	5(9.09%)
07/12/17	54(100%)	11(20.37%)	30(55.55%)	7(12.96%)	6(11.11%)
19/12/17	37(100%)	5(13.51%)	8(21.62%)	12(32.43%)	12(32.43%)

CEE= cantidad de explantos establecidos. CEC= explantos contaminados; CENV= cantidad de explantos no viables. CEAAV = cantidad de explantos asépticos con apariencia viables; CEAVPV= cantidad de explantos asépticos, viables con pigmentación verde

De igual manera, con el maguey tepextate (*Agave marmorata*) se obtuvo la formación de brotes adventicios a partir de los explantos de tejidos de tallo, incubados durante 80 días (Cuadro 2). En condiciones similares de cultivo, la respuesta de la organogénesis presentó algunas variaciones que dependen de la especie, ya que en algunos brotes de *Agave angustifolia* ocurrió la formación de raíces, mientras que en el *Agave marmorata* los brotes adventicios formados fueron de mayor tamaño y su pigmentación verde más oscura.

Cuadro 2. Cultivos asépticos *in vitro* de tejidos de tallo de maguey tepextate (*A. marmorata*), que en el transcurso de 80 días mostraron respuesta de organogénesis

Fecha	CEE y (%)	CEC y (%)	CENV y (%)	CEAAV y (%)	CEAVPV (%)
27/10/17	16(100%)	14(87.5%)	1(6.25%)	1(6.25%)	0(0%)
16/11/17	19(100%)	15(78.94%)	1(5.26%)	2(10.52%)	1(5.26%)
30/11/17	27(100%)	17(62.96%)	2(7.40%)	3(11.11%)	5(18.51%)
08/12/17	27(100%)	15(55.55%)	3(11.11%)	6(22.22%)	3(11.11%)
19/12/17	25(100%)	9(36%)	3(12%)	7(28%)	6(24%)

CEE= cantidad de explantos establecidos. CEC= explantos contaminados; CENV= cantidad de explantos no viables. CEAAV = cantidad de explantos asépticos con apariencia viables; CEAVPV= cantidad de explantos asépticos, viables con pigmentación verde



Figura 2. Etapas de desarrollo de los tejidos de tallo del maguey tepextate (*Agave marmorata*).

CONCLUSIONES

Fue posible el establecimiento de cultivos asépticos de tejidos de tallos de *A. marmorata* y *A. angustifolia*, como paso inicial para la propagación *in vitro*. A partir de 20 plantas de *Agave angustifolia* se obtuvo un total de 586 explantos de tejidos de tallo, de los cuales 202 (34.47%) resultaron asépticos, viables, con pigmentación verde e inicios de respuesta de organogénesis, en cuatro de estos explantos ocurrió la formación de pequeños brotes adventicios. A partir de 15 plantas de *Agave marmorata* se obtuvieron 228 explantos de tejidos de tallo, de los cuales 68 (29.82%) resultaron asépticos, viables, con pigmentación verde e inicios de respuesta de organogénesis, en ocho de éstos ocurrió la formación de brotes adventicios.

LITERATURA CITADA

- Das, T. 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 253–255.
- Domínguez-Rosales, M. S., J. González, Ma. de la L., G. C. Rosales, C. Quiñones V., de L. S. Delgadillo D., S. J. Mireles O. y E. Pérez, B. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Revista Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 16(41): 53-62.
- Enríquez-del Valle, J.R., G. Carrillo-Castañeda y J.L. Rodríguez-de la O. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28: 175-178.
- Enríquez-del Valle, J. R. 2008. La propagación y crecimiento de Agaves. Fundación Produce Oaxaca A. C. e Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. México. 48 p.
- Hazra, S. K., D. Sudripta and A. K. Das. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 70: 235–240.
- Jiménez-Valdés, M., H. M. Godínez-Álvarez, J. Caballero and R. Lira. 2010. Population Dynamics of *Agave marmorata* Roehl. under Two Contrasting Management Systems in Central Mexico. *Economic Botany* 64(2): 149-160. <https://doi.org/10.1007/s12231-010-9117-0>

- Madrigal L., R., F. Pineda-Estrada, J.L Rodríguez-de la O. 1990 Agave. pp 206–227. *In: Handbook of Plant Cell Culture, Vol 5. Ornamental Species, Chapter 9.* Ammirato, PV, Evans, DA, Sharp, WR & Bajaj, YPS (Eds). New York. McGraw Hill Publ. Co.
- Martínez T., S., T. Cisneros-Méndez, V. Lara-Echegaray & A. Linares-Martínez. 2013. Diagnóstico del sistema producto maguey-mezcal en el estado de Oaxaca. Universidad Autónoma de Chapingo (UACH). México. 176 p.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962 A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15: 473-497.
- Nikam, T.D. 1997. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51: 225- 228.
- Nikam, T.D., G. M. Bansude and K. C. Kumar. 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*A. sisalana* Perr. ex. Engelm). *Plant Cell Reports* 22: 188-194.
- Palma, F., P. Pérez y V. Meza. 2016. Diagnóstico de la cadena de valor mezcal en las regiones de Oaxaca. Oaxaca. COPLADE- Gobierno del Estado de Oaxaca. 83 p.
- Portillo, L., F. Santacruz-Ruvalcaba, A. Gutiérrez-Mora and B. Rodríguez-Garay. 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Rev In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 43: 569–575.
- Ríos-Ramírez S.C., J.R. Enríquez-del Valle, G. Rodríguez-Ortiz, J. Ruíz-Luna and V. A. Velasco-Velasco. 2018. *In vitro* formation of adventitious shoots on caulinary tissue of physiologically contrasting *Agave angustifolia* plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 30(1): 49-56. doi: 10.9755/ejfa.2018.v 30.i1.1584
- Robert, M. L., L. Herrera J., F. Contreras and N. K. Score. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem (Henequén). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 8: 37-48.
- Rodrigues-Borges S., A. Xavier, L. Silva-de Oliveira, A. Pontes L., W. Campos O., E. Keiko T. & L. Amaral-de Melo. 2012. Establecimiento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. *Ciência Florestal, Santa Maria* 22(3): 605-616. <http://www.scielo.br/cflo>
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. pp. 633-650. *In: Proceedings 6 International Congress on Soilless Culture.* Wageningen. The Netherlands.
- Thompson M.R. and T.A. Thorpe. 1997. Analysis of protein patterns during shoot initiation in cultured *Pinus radiata* cotyledons. *J. Plant Physiol* 151: 724- 734.
- Valenzuela-Sánchez, K. K., R. E. Juárez-Hernández, A. Cruz-Hernández, V. Olalde- Portugal, M. E. Valverde y O. Paredes-López. 2006. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 42: 336–340.
- Villalobos, V.M., E. C. Yeung and T. A. Thorpe. 1985. Origin of adventitious shoots in excised *radiata* pine cotyledons cultured *in vitro*. *Can. J. Bot.* 63: 2172- 2176.