

# BIOCONVERSIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Heliconia stricta* Huber UTILIZANDO LOS SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL "RITA"

## BIOCONVERSION OF SOMATIC EMBRYOS OF *Heliconia stricta* Huber USING TEMPORARY INMERSION SYSTEMS "RITA"

Lucía Atehortúa<sup>1</sup> y Claudia I. Valencia<sup>2</sup>

### Resumen

Masas de callos embriogénicos de *Heliconia stricta* Huber, conocida comúnmente como platanillo (ornamental tropical), fueron pesados antes de ser llevados a procesos de bioconversión en los sistemas de inmersión temporal "RITA", con el fin de evaluar el efecto de los medios de cultivo, tiempos, frecuencia de inmersión y eficiencia de bioconversión de dichos callos en embriones somáticos y plántulas. Los resultados mostraron que de los cuatro medios evaluados, sólo uno presentó un tipo de desarrollo. Los cuatro medios evaluados fueron: M1 (SH suplementado con vitaminas MS, biotina 1 mg/l, ANA 1mg/l, ácido acetil salicílico 0.018 mg/l y sacarosa 40 g/l), M2 (SH completo, suplementado con caseína hidrolisada 1 g/l, zeatina 0.2 mg/l y sacarosa 40 g/l), M3 (MS completo a la mitad de su concentración, suplementado con ABA 0.1 mg/l, AIA 1 mg/l, L-glutamina 50 mg/l y sacarosa 40 g/l) y M4 (MS completo a la mitad de su concentración y sacarosa 40 g/l). No hubo diferencias significativas con relación a la producción de embriones coleoptilares, y con respecto a las plántulas nunca lograron desarrollarse bajo ninguno de los medios ensayados. En relación con los tiempos y frecuencia de inmersión evaluados, tres minutos cada seis horas, seis minutos cada seis horas y un minuto cada doce horas, los resultados mostraron que el mejor tiempo de inmersión fue un minuto cada doce horas.

**Palabras clave:** *Heliconia stricta* Huber, platanillo, embriogénesis somática, inmersión temporal, contenedores RITA.

### Abstract

Clusters of embryogenic callus of *Heliconia stricta* Huber, commonly known as "platanillo" (tropical ornamental), were weighted before being taken inside a temporary immersion system "RITA", in order to evaluate the effect of culture media, time and frequency as well as efficiency of bioconversion into embryos and plantlets. The results showed that from the four different media initial evaluated M1 (SH supplemented with vitamins MS, biotin 1 mg/l, ANA 1mg/l, acetil salicylic acid 0.018 mg/l y sucrose 40 g/l); M2 (SH plus vitamins, supplemented with hydrolyzed casein 1 g/l, zeatin 0.2 ml/l and sucrose 40 g/l); M3 (MS plus vitamins at half of its concentration, supplemented with ABA 0.1 ml/l, IAA 1 mg/l, L-glutamine 50 mg/l and sucrose 40 g/l) and M4 (MS plus vitamins at half of its concentration and sucrose 40 g/l), only the M3 showed some type of response and therefore it was selected for the final bioassay in which there were changes in sucrose concentration (40 and 60 g/l) with six repetitions each. The statistical design selected for this bioassay were one way variance analysis and Kruskal Wallis test. That analysis indicated that for the coleoptilar embryos there were not significant differences in relation to their production, and there was not any bioconversion of the somatic embryos into plantlets. For the time and frequency of immersion evaluated, the results showed that the best results were obtained with twelve hours with a one minute of immersion.

**Key words:** *Heliconia stricta* Huber, tropical ornamental, somatic embryogenesis, temporary immersion, RITA containers.

Recibido: diciembre de 2001; aprobado para publicación: marzo de 2002.

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín. E-mail: latehor@quimbaya.udea.edu.co.

<sup>2</sup> Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín. E-mail: cvalencia67@yahoo.com.

## INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de plantas e inflorescencias de heliconias (platanillos) como plantas ornamentales tropicales para nuevos programas de exportación no tradicionales, además del desarrollo de programas ambientales de recuperación de áreas degradadas, protección de cuencas y suelos, programas de paisajismo urbano y rural, y como alternativa para sustitución de cultivos ilícitos, están creando una fuerte presión sobre las poblaciones naturales donde estas especies crecen en forma silvestre. Sumado a todo lo anterior, el crecimiento de estas especies es muy lento, debido a que son tradicionalmente propagadas mediante rizomas y semillas, y estas últimas tardan de tres meses a tres años en germinar (Montgomery, 1986). Todo esto limita su reproducción a gran escala y justifica el desarrollo de tecnologías modernas que permitan superar estos problemas.

Dentro de los sistemas de micropropagación, la tendencia moderna está dirigida a la producción de plantas vía cultivo de tejidos, utilizando procesos tales como la embriogénesis somática, la cual presenta ventajas comparativas y competitivas frente a los sistemas convencionales de micropropagación, como lo es el cultivo de meristemos.

La ventaja de la embriogénesis somática sobre otros sistemas de propagación es que ésta permite generar cantidades masivas de plántulas susceptibles de ser automatizadas y que pueden estar disponibles todo el año, independiente de los factores ambientales, los cuales afectan la propagación convencional. En consecuencia, el desarrollo de un protocolo eficiente para la multiplicación masiva y con altos niveles de bioconversión de sus embriones podría ser una contribución invaluable para la propagación a bajo costo y la posterior transformación genética de heliconias.

Con el fin de garantizar la bioconversión de dichos embriones somáticos en plántulas, se desarrolló la presente investigación utilizando los sistemas de inmersión temporal (RITAS), en los cuales se evaluó el efecto de diferentes medios de cultivo, frecuencias y tiempos de inmersión sobre la bioconversión de callos embriogénicos de esta especie.

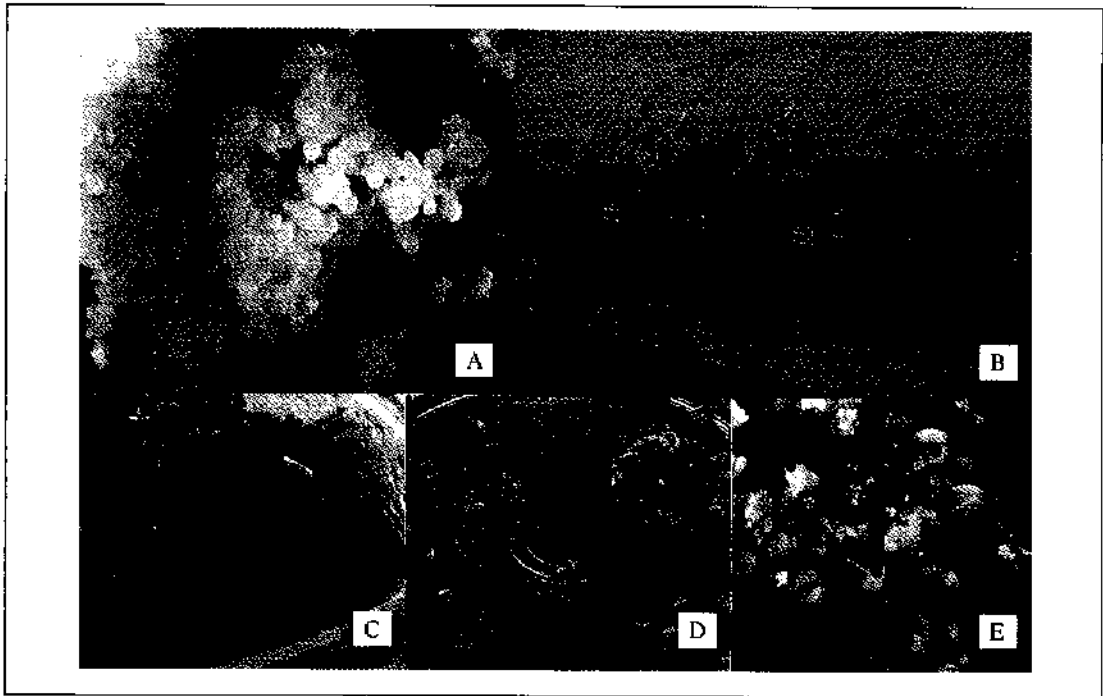
Aunque un buen número de sistemas automatizados han sido desarrollados para la propagación de especies vegetales, basados en la adición y remoción del medio líquido (Akiten-Christie y Davies, 1988; Akiten-Christie y Jones, 1987; Tisserat y Vandercook, 1985), a la fecha ningún trabajo ha sido reportado para heliconias.

Por otro lado, Alvard *et al.* (1993) lograron demostrar la aplicación potencial de los sistemas de inmersión temporal (SIT) por primera vez en la micropropagación de banano y desde esa fecha los SIT se han extendido a otras especies, tales como *Hevea brasiliensis* (caucho) (Etienne *et al.*, 1997), *Citrus* (Cabasson *et al.*, 1997), *Saccharum officinarum* (caña de azúcar) (Lorenzo *et al.*, 1998), *Ananas comosus* (piña) (Escalona *et al.*, 1999), *Camellia sinensis* (té) (Akula *et al.*, 2000), *Solanum tuberosum* (papa) (Jiménez *et al.*, 1999), *Eucalyptus grandis* (goma rosa) (Castro y González, 2001) y *Bactris gasipaes* (chontaduro) (Atehortúa y Naranjo, en impresión).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Masas de callos embriogénicos de *H. stricta* Huber (figura 1a), obtenidos en medios sólidos y precultivados en el medio basal MS completo suplementado con 2,4-D 4 mg/l, AIA 4 mg/l, ANA 1 mg/l, biotina 1 mg/l y sacarosa 30 g/l a un pH de 5.7 y fitagel 1.6 g/l, fueron utilizados en esta investigación. Los embriones fueron desarrollados a una intensidad lumínica bajo lámparas fluorescentes de 700 LUX, con un fotoperiodo de 24 horas a  $25 \pm 1$  °C.

**Sistemas de inmersión temporal y medios de cultivo.** Un sistema de cultivo de inmersión temporal de doce contenedores (Teisson y Alvard, 1995) fue utilizado para la bioconversión de las masas de callos embriogénicos de *H. stricta* provenientes de medio sólido. Los sistemas de inmersión temporal (SIT), conocidos como "RITAS" (CIRAD, Francia), consisten en un contenedor de un litro, con un compartimento superior en el cual es colocado el material de la planta, y un compartimento inferior que



**Figura 1.** A. Callos embriogénicos listos para ser inoculados en los SIT. B. SIT ensamblados en serie para la realización de los diferentes bioensayos. C. Callos embriogénicos en diferentes estadios de desarrollo dentro de los SIT. D. Callos embriogénicos en estado de necrosis y después de ser sometidos durante tres minutos de inmersión temporal por períodos de seis horas. E. Callos embriogénicos del cultivo control mostrando diferentes estadios de bioconversión.

contiene el medio de cultivo líquido. Los dos compartimentos son conectados a una bomba peristáltica y a un temporizador, la cual transfiere el medio líquido del compartimento inferior al compartimento superior (figura 1b).

Sobre una malla de espuma fueron puestos, en promedio, 9 g de masas de callos embriogénicos (figura 1a) dentro de cada contenedor RITA, utilizando 200 ml de medio líquido de cultivo por contenedor (figura 1c). Dichos medios fueron renovados cada treinta días. Las frecuencias de cultivo fueron establecidas así: cada seis horas con un tiempo de inmersión de tres y seis minutos y cada doce horas con un tiempo de inmersión de un minuto. Los medios de cultivo evaluados fueron los siguientes:

M1: SH suplementado con vitaminas MS, biotina 1 mg/l, ANA 1 mg/l, ácido acétil salicílico 0.018 mg/l y sacarosa 40 g/l; M2: SH completo suplementado con caseína hidrolizada 1 mg/l y sacarosa 40 g/l; M3:

MS completo a la mitad de su concentración, suplementado con ABA 0.1 mg/l, AIA 1 mg/l, L-glutamina 50 mg/l y sacarosa 40 g/l; M4: MS completo a la mitad de su concentración y sacarosa 40 g/l.

De estos cuatro medios ensayados inicialmente, sólo se seleccionó el M3, debido a que fue el único medio en que hubo una supervivencia de 80% de los callos. Con el fin de evaluar el efecto de este medio, se procedió a modificar la concentración de sacarosa y se seleccionaron dos concentraciones (40 y 60 g/l) con seis repeticiones cada una, y se les denominó medios 1 y 2, siendo el 3 el medio de control (tabla 1).

El diseño estadístico seleccionado para este bioensayo fue un análisis de varianza en una sola vía y el test de Kruskal-Wallis. Durante este bioensayo se cuantificaron el número de embriones coleoptilares formados a partir de los callos embriogénicos, pero no de plántulas, debido a que no hubo ninguna bio-

**Tabla 1.** Valores promedio del número de embriones coleoptilares en los medios de cultivo (1) y (2), comparados con el medio control (3)

Medios de cultivo	Nº de repeticiones	Promedio de coleoptilares	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
1	6	28.25	1.75864	26.4914	30.0086
2	6	26.33	1.68025	24.6531	28.0136
3*	6	69.17	5.054	64.1127	74.2207

Con 95.0 % para los intervalos LSD; \* = control.

conversión en ninguno de los contenedores SIT. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza en una sola vía y utilizando el test de Kruskal-Wallis para determinar si había o no diferencias significativas entre los medios evaluados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Efecto de las condiciones de cultivo.** Aunque los resultados esperados para este tipo de ensayos es lograr la bioconversión de los embriones en plántulas, las respuestas observadas y registradas para esta especie en particular indican que los procesos de bioconversión no fueron los esperados. Entre las posibles causas que pudieron dar origen a este tipo de respuestas, podrían mencionarse una serie de factores que solos, o en forma sinérgica, afectaron los tejidos y los procesos de bioconversión. Entre las probables causas que han sido consideradas en esta investigación podrían mencionarse las siguientes:

**Vitrificación.** Este fenómeno fue observado durante todo el desarrollo de la investigación y se ha considerado que el cúmulo de agua atrapada, tanto a nivel de las células como de los tejidos de los callos embriogénicos (en donde no existen órganos desarrollados, ni especializados), además de la alta concentración de humedad atrapada entre el material de espuma de poliuretano que sirvió de soporte a dichos callos, pudo haber desencadenado los procesos de vitrificación por hiperhidratación o por un shock osmótico, los cuales fueron evidenciados por la fragilidad, quiebre y fractura de los embriones, cuando éstos fueron retirados de los contenedores para ser llevados nuevamente a medios sólidos, además de su apariencia translúcida, tal como ha sido

descrito por otros autores para otras especies vegetales cuando se establecen cultivos *in vitro* en medios líquidos ausentes de agar (Hauziniska, 1974; Davis *et al.*, 1977; Sutter y Langhans, 1979; Debergh, 1983; Hakkaart y Versluijs, 1983; Druart *et al.*, 1984; Kevers *et al.*, 1984; Pâques y Boxus, 1984 y 1987b; John, 1986), en medios semilíquidos o hiperhidratados (Jones, 1976; Werner y Boe, 1980; Gaspar *et al.*, 1987) o en cultivo de callos (Crèvecoeur *et al.*, 1987), en donde se concentran una alta cantidad de fenoles, que son menos solubles (Kevers *et al.*, 1984). Sin embargo, este fenómeno no se observa en condiciones naturales, aun bajo condiciones de hiperhidratación, donde los rizomas son estructuras tuberosas que almacenan carbohidratos y agua y probablemente constituyen una barrera para la alta infiltración excesiva de iones y agua.

Por otro lado, aun cuando se modificaron las condiciones de inmersión en SIT (un minuto cada doce horas), no dadas en el control, éstos continuaron los procesos de vitrificación y fenolización, originando un proceso de necrosamiento y muerte de los embriones (figura 1 d).

**Factores fisicoquímicos.** Otro factor que se ha hipotetizado como causal de vitrificación ha sido el imbalance entre las auxinas y citoquininas (Beauchesne, 1981), posteriormente demostrado por Leshem y Sachs (1985), Densco (1987) y Orlikowska (1987). Para el caso de esta investigación, este factor también pudo haber incidido en las respuestas obtenidas, ya que los tejidos estuvieron sometidos a una concentración extracelular de auxinas, con el fin de inducir la formación de callos embriogénicos, y como etapa previa a la inmersión temporal.

Otros investigadores, por su lado, también atribuyen la vitrificación a varios factores tales como el tipo de recipiente de cultivo, el tipo de sellado del recipiente y la concentración de agar, y a factores climáticos del área de cultivo (Hakkaart y Versluijs, 1983; Debergh y Maene, 1984).

Aunque no se han reportado efectos de la luz sobre la vitrificación, en esta investigación se ha considerado que la intensidad lumínica pudo tener algún efecto, quizás no en la vitrificación, pero sí en la bioconversión de los embriones somáticos a plántulas. El color ámbar de los SIT pudo ser un factor que contribuyó a los resultados obtenidos, ya que no favoreció la bioconversión en plántulas de los pocos embriones formados. Esta aseveración está sustentada por las observaciones registradas en los cultivos control (medios sólidos), en los cuales, a pesar de que los callos embriogénicos estuvieron sometidos a la misma intensidad lumínica que en los SIT, la bioconversión fue evidenciada por un cambio de color de blancos a verdes (figura 1e), debido a la presencia de clorofila, la cual es un buen indicador de la iniciación de los procesos de fotosíntesis. El color ámbar probablemente fue un factor limitante, ya que se convirtió en un filtro para la entrada de la baja intensidad lumínica suministrada (700 lux).

**Medios de cultivo.** La tabla 1 muestra los valores promedios del número de embriones coleoptilares (figura 1c) obtenidos en los medios (1) y (2) (tabla 2); allí se observa un mayor valor promedio para el medio control (3) (figuras 1e y 2).

De acuerdo con el análisis estadístico de los resultados y a la prueba de Kruskal-Wallis, los datos registrados en la tabla 3 indican que no hubo diferencias significativas ( $P = 0.367066$ ) entre los medios evaluados (1) y (2). Al respecto, el único cambio fue la concentración de sucrosa (40 y 60 g/l). Lo anterior soporta algunas observaciones de varios investigadores que sugieren reemplazar la sucrosa por fructosa con el fin de evitar la vitrificación (Rugini *et al.*, 1987), mientras que otros también recomiendan aumentar la intensidad lumínica durante el cultivo a valores superiores de 17.000 lux (Maene, 1985).

La figura 2 ilustra las diferencias de respuesta entre los medios (1) y (2) con relación al medio control (3).

**Tabla 2.** Prueba de Kruskal-Wallis para el número de embriones coleoptilares para el análisis de respuesta en los medios de cultivo (1) y (2), comparados con el medio control (3)

Medios de cultivo	N° de repeticiones	Rango promedio
1	6	13.7917
2	6	11.2083
3*	6	30.5000

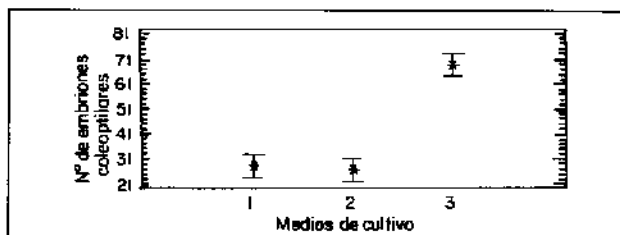
Prueba estadística = 23.8225; P-Value = 0.00000671457; \* = control.

**Tabla 3.** Prueba de Kruskal-Wallis para el número de embriones coleoptilares para el análisis de respuesta en los medios de cultivo (1) y (2)

Medios de cultivo	N° de repeticiones	Rango promedio
1	6	13.7917
2	6	11.2083

Prueba estadística = 0.813567; P-Value = 0.367066.

Aunque los SIT se están utilizando con éxito en la bioconversión de embriones somáticos de algunas especies, para la estandarización de la técnica de bioconversión de esta especie sería recomendable, hacia el futuro, la utilización de contenedores de mayor iluminación y con un soporte diferente a la espuma de poliuretano, que además de eliminar los altos riesgos de contaminación, también impida la acumulación de iones y agua sobre los tejidos, contribuyendo de esta manera a reducir o minimizar los riesgos de vitrificación y fenolización, ya que ambos conducen a la necrosis y muerte de los callos embriogénicos.



**Figura 2.** Medias e intervalos con 95.0% LSD para el número de embriones coleoptilares producidos en los medios (1) y (2), comparados con el medio control (3)

## AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto fue realizado gracias a la financiación del Fondo de Proyectos Aplicados de la

Vicerrectoría de Extensión de la Universidad de Antioquia.

## REFERENCIAS

- Akiten-Christie J, Jones C.** 1987. Toward automation: radiata pine shoot edges *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 8:185-196.
- Akiten-Christie J, Davis H.** 1988. Development of a semi-automated micropropagation system. *Acta Hort* 230:81-87.
- Akula A, Becker D, Bateson M.** 2000. High yielding repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in a selected tea clone, «TRI-2025», by temporary immersion. *Plant Cell Reports* 19:1.140-1.145.
- Alvard D, Cote F, Teisson C.** 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effect of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 32:55-60.
- Beauchesne G.** 1981. Les milieux minéraux utilisés en culture *in vitro* et leur incidence en l'apparition de boutures d'aspect pathologique. *CR Aca Agric Paris* 67:1.389-1.397.
- Cabasson C, Alvard D, Dambier D, Ollitrant P, Teisson C.** 1997. Improved citrus somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 50:33-37.
- Castro DC, González JL.** 2001. Control de condiciones ambientales y medio de cultivo para la propagación de *Eucalyptus grandis* en el sistema de inmersión temporal. *Actual Biol* 23(75):13-18.
- Crèvecoeur M, Kevers C, Gaspar T.** 1987. A comparative biochemical and cytological characterization of normal and habituated sugarbeet calli. *Biol Plant* 29:1-6.
- Davis MJ, Baker R, Hanan JJ.** 1977. Clonal multiplication of carnation by micropropagation. *J Am Soc Hortic Sci* 102:48-53.
- Debergh PC.** 1983. Effects of agar brand and concentrations on the tissue culture medium. *Physiol* 59:270-276.
- Debergh PC, Maene LJ.** 1984. Preparation of tissue culture plants for rooting and establishment *in vivo*. In: Novak FJ, Havel T, Dolezel K (eds.). *Proc Int Symp Plant Tissue Cell Cult. Applic Crop Improv.* Czechoslovakia, Acad. Sci. Prague, pp. 487-495.
- Densco I.** 1987. Factors influencing vitrification of carnation and conifers. *Acta Hort* 212:167-176.
- Druart P, Pâques M, Boxus P.** 1984. Morphologie anormale semblable aux symptômes de vitrification rencontrés au cours de la micropropagation de *P. glandulosa* Thunb. var. *simensis*. Influence de l'AVG, de l'AIBA et d'AgNO<sub>3</sub>. *Arch Int. Physiol Biochim* 92(1):V22-V23.
- Escalona M, Lorenzo C, González B, Daquinta M, González JL, Desjardins Y, Barroto CG.** 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* 18:743-748.
- Etienne H, Lartaud N, Michaux-Ferriere N, Carron M, Berthouly M, Teisson C.** 1997. Improved somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (MULL-ARG.) using the temporary immersion technique. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 33:81-87.
- Etienne-Barry D, Bertrand B, Vaswuez N, Etienne H.** 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass produced in a biorreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Reports* 19:11-117.
- Gaspar T, Kevers C, Debergh P, Maene L, Pâques M, Boxus P.** 1987. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: Bonga JM, Durzan DJ (eds.). *Cell and tissue culture in forestry*. Vol. 1. *General principles and biotechnology*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp. 152-166.
- Hakkaert FA, Versluijs JM.** 1983. Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures. *Neih J Plant Pathol* 89:7-53.
- Hauziniska E.** 1974. L'organogenèse dans le tissu de cal de l'oeillet (*Dianthus caryophyllus*) dans les conditions de culture *in vitro*. In: *Proc 19<sup>th</sup> Hort Congr*, Warsaw 1A: 60.
- Jiménez E, Pérez N, De Fera M, Barbo R, Capote A, Chávez M, Quiala E, Pérez JC.** 1999. Improved production of potato microtubers using temporary immersion system. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 59:19-23.
- John A.** 1986. Vitrification in Sitka spruce culture. In: Withers L, Alderson PG (eds.). *Plant tissue culture and its agriculture applications*. Butterworth, London, pp. 167-174.
- Jones OP.** 1976. Effects of phoridzin and phlorogucinol on apple shoots. *Nature* 262:393.
- Kevers C, Coumans M, Coumans-Gilles MF, Gaspar TH.** 1984. Physiological and biochemical events leading to vitrification in plants cultured *in vitro*. *Physiol Plant* 61: 69-74.
- Leshem B, Sachs T.** 1985. Vitrified *Dianthus teratoma in vitro* due to growth factor imbalance. *Ann Bot* 56:613-617.
- Lorenzo JC, González BL, Escalona M, Teisson C, Espinosa P, Borroto C.** 1998. Surgarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 54:197-200.
- Maene L.** 1985. Optimalisering van de commerciële vermeerdering van planten *in vitro*. *Mede Centr Studie Voorplanting bij Tuinbouwgewassen*, IWONL. Gent. 47 p.
- Montgomery R.** 1986. Propagation of *Heliconia* from seeds. *Bull Heliconia Soc Int* 1(2):6-7.
- Orlikowska T.** 1987. Vitrification problem in the *in vitro* culture of fruit tree rootstocks. *Acta Hort* 212:239-244.
- Pâques M, Boxus P.** 1984. Comparative study of vitreous and nonvitreous plantlets of apple rootstock M-26 cultivated *in vitro*. *Abstr Book*, 4th Congr Fed Eur Soc Plant Physiol, Strasbourg, pp. 282-283.
- Pâques M, Boxus P.** 1987b. Vitrification: a phenomenon related to tissue water content? *Acta Hort* 212:245-252.
- Rugini E, Tarini P, Rossodivita ME.** 1987. Control of shoot "vitrification" of almond and olive grown *in vitro*. *Acta Hort* 212:177-183.

- Stein M, Stephens C.** 1991. Effect of diclorophenoxyacetic acid and activated charcoal in somatic embryogenesis of *Baccharis gasipaes* H.B.K. *Turrialba* 41(2):196-201.
- Sutter E, Langhans RW.** 1979. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *J. Am Soc Hortic Sci* 104:493-496.
- Teisson C, Alvard D.** 1995. A new concept of plant *in vitro* cultivation in liquid medium: temporary immersion. *In:* Terzi M, Cella R, Falagvigna A (eds.) *Current issues in plant molecular and cellular biology*. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, pp. 105-109.
- Tisserat B, Vandercook CE.** 1985. Development of an automated plant culture system. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 5:107-117.
- Werner EM, Boe AA.** 1980. *In vitro* propagation of Mailling-7 apple rootstocks. *Hort Sci* 15:509-510.