

Empleo de la Biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas

Elisa Quijala^{1*}, Grecia Montalvo², Jesús Matos². *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní, km 5.5. Santa Clara. Cuba.

²Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna. Villa Clara.

RESUMEN

La rápida disponibilidad de posturas para la restauración de la cubierta vegetal en un ecosistema degradado, constituye uno de los principales factores que influye en los programas de restauración ecológica. Las técnicas de cultivo de tejidos resultan atractivas para la propagación de especies amenazadas, debido a las altas tasas de multiplicación que se obtienen y al reducido material vegetal de partida requerido y se considera a las cactáceas como la familia más trabajada desde este punto de vista. El empleo de citoquininas, preferentemente el 6-BAP durante la etapa de multiplicación permite la obtención de nuevos brotes, cuyo número depende de la especie en cuestión y de la concentración en que se utilice este regulador del crecimiento. La fase de enraizamiento se logra con relativa facilidad cuando se emplean medios de cultivos simples generalmente sin reguladores del crecimiento. Cuba tiene una amplia flora vascular, en la cual se destacan diversos géneros de cactáceas, pero al igual que otros países del trópico tiene una gran destrucción de sus hábitat debido a la acción devastadora del hombre, es por ello que el desarrollo de técnicas alternativas como el cultivo de tejidos *in vitro* pueden ayudar a contrarrestar la pérdida de esta biodiversidad.

Palabras clave: micropropagación, peligro de extinción, conservación de biodiversidad, cultivo *in vitro*

ABSTRACT

The quick readiness of postures for the restoration of the vegetable cover in a degraded ecosystem constitutes one of the main factors in the ecological restoration programs. The *in vitro* tissue culture techniques are attractive for the propagation of threatened species, due to the discharges multiplication rates that are gotten in a relatively short time and to the reduced required departure material and from this point of view it is considered to the cactaceae like the family more worked. Cuba has a wide vascular flora, in which stand out diverse cactuses goods, but the same as other countries of the tropic have a great destruction of their habitat due to the man's devastating action, so that the development of alternative techniques as tissue culture can help to counteract the loss of the biodiversity in the Cuban flora.

Key word: micropropagation, extinction danger, biodiversity conservation, *in vitro* tissue culture

INTRODUCCIÓN

La conservación de la biodiversidad es un tema que ha venido ganando relevancia de forma progresiva en la sociedad. La conservación de la flora silvestre constituye una pieza clave dentro de este enmarque. No sólo se trata de la obligación ética de preservar esta riqueza natural para las generaciones venideras o del puro interés científico que puede aportar. La sociedad es cada vez más consciente de la importancia de la flora silvestre como fuente de alimentos, aceites y lubricantes, gomas, resinas, ceras, colorantes, fibra, energía, sustancias aromáticas y principios medicinales, por su valor ornamental y por su valor ecológico como indicador y elemento restaurador de situaciones ambientales degradadas (McNeely *et al.*, 1990; Prance, 1997). El archipiélago cubano tiene una riqueza florística bien conocida, con una flora vascular de unas 6 700

especies (Borhidi y Muñiz, 1983) y un 51.4 % de endemismo. Cuba posee una de las floras insulares más ricas del mundo, pero al igual que la gran mayoría de los países del trópico presenta problemas con la destrucción de sus ecosistemas naturales y unas 950 especies corren determinados riesgos a corto o mediano plazo (Shemske, 1994). Ante estos datos, se impone la necesidad de tomar medidas y desarrollar estrategias encaminadas a contrarrestar la pérdida de la biodiversidad vegetal.

La biología de la conservación como ciencia surge debido a que ninguna de las ciencias actuales por sí sola podía responder a la creciente crisis que afronta la diversidad biológica (Primak, 2000) y la misma contempla que para la conservación de la biodiversidad pueden utilizarse las técnicas de conservación *in situ*, *ex situ* y la integrada (Mc Nelly *et al.*, 1990). Esta última involucra diversas disciplinas para de esta

forma resolver las situaciones que cada especie pueda presentar, donde las técnicas de cultivo *in vitro* son utilizadas en casos donde la propagación por vías tradicionales no es efectiva (Prance, 1997; Pence, 1999; Iriondo, 2001). El desarrollo de las investigaciones es marcadamente multidisciplinario, ya que involucra necesariamente la presencia de diversos especialistas: taxónomos, etnobotánicos, químicos y biotecnólogos, así como otras especialidades que pudieran requerirse.

PROPAGACIÓN DE ESPECIES AMENAZADAS

Las técnicas de propagación vegetativa son muy importantes para la conservación de la integridad genética del material vegetal. Las mismas se han desarrollado a lo largo de varios siglos y la investigación en este campo es todavía muy activa (Iriondo, 2001). Su utilización en el campo de especies vegetales amenazadas reside fundamentalmente en los jardines botánicos y áreas protegidas, a la hora de multiplicar material vegetal para su exposición, con fines de estudio o intercambio. Estas técnicas también pueden ser utilizadas para la obtención de material vegetal destinadas a trabajos de restauración ecológica, introducción o reintroducción cuando la reproducción por métodos tradicionales no resulta factible o eficaz. No obstante, la propagación por vías tradicionales tiene como principal inconveniente el largo tiempo que media entre la obtención de las nuevas posturas hasta su reintroducción, así como las bajas tasas de multiplicación que dificultan la disponibilidad de gran cantidad de posturas, con lo cual se alargan los programas de restauración ecológica (Pence, 1999).

Las técnicas de cultivo de tejidos resultan atractivas para la propagación de especies amenazadas, debido a las altas tasas de multiplicación que se obtienen y al reducido material de partida requerido. Estas han sido utilizadas de forma extensiva en la propagación y conservación de recursos fitogenéticos en la agricultura. De igual manera han sido adaptadas para su utilización en un amplio número de especies silvestres con problemas de propagación por métodos convencionales y/o con poblaciones extremadamente reducidas (Feijóo, 2000; Iriondo, 2001).

USO DE LA BIOTECNOLOGÍA EN LA PROPAGACIÓN DE ESPECIES CACTÁCEAS

La amenaza de extinción de numerosas especies ha sido señalada por diversos especialistas y es un problema que requiere de solución inmediata; las cactáceas son, junto con las orquídeas, probablemente las familias más severamente amenazadas en los países del trópico y por tanto las más trabajadas desde el punto de vista biotecnológico. Las técnicas de cultivo de tejidos han sido aplicadas satisfactoriamente en la propagación de diferentes familias de cactáceas amenazadas (Mc comb, 1985;

Conway, 1988). Entre estas especies se encuentran: *Melocactus matanzanus* (Alemán *et al.*, 1993), *Mamillaria* sp, *Astrophytum capricorne*, *Melocactus holguinensis* (Hernández *et al.*, 1994), *Pilosocereus robinii* (Quiala *et al.*, 2003) y *Pilosocereus* sp. (Montalvo *et al.*, 2004). Estas técnicas de cultivo de tejidos pueden complementarse con otras que se realizan en el cultivo *in situ* y cuya combinación puede ser de gran importancia para la solución de diferentes especies amenazadas (Touchell y Dixon, 1999).

El proceso de propagación *in vitro* conlleva cinco fases (Clemente, 1999): Fase 0) selección y preparación de las plantas madre donadoras de los explantes, las cuales deben encontrarse en condiciones fisiológicas y sanitarias óptimas; Fase 1) establecimiento del cultivo, se introducen los explantes iniciales bajo condiciones de asepsia en el medio de cultivo, estos son previamente sometidos a una desinfección; Fase 2) multiplicación, a partir de las yemas axilares de los tallos en desarrollo o mediante la inducción de yemas adventicias; Fase 3) elongación de los tallos y enraizamiento, y Fase 4) aclimatización a condiciones *ex vitro*, mediante la exposición progresiva de las plantas a condiciones controladas de temperatura, luz y humedad.

Selección del explante inicial

Una cuidadosa selección del material vegetal de partida y de los medios de cultivo son aspectos indispensables a la hora de propagar especies amenazadas (Lynch, 1999). Esta selección se hace de forma muy diferente a cuando se trabaja con especies de interés agrícola, para este último caso se selecciona una planta donante con características agronómicas deseadas y a partir de la cual se obtienen miles de individuos con iguales características. En el caso de las especies amenazadas se colectan semillas de todos los individuos presentes en la población, de forma tal que en el material vegetal que se introduzca quede representada la biodiversidad presente en la población natural. Se debe tomar además la precaución de mantener controlada la identidad genética del material vegetal propagado y el establecimiento de líneas para la producción a gran escala de igual número de genotipos distintos. Cuando se trata de conservar la mayor diversidad genética posible de una población, las semillas constituyen normalmente el material de propagación preferido.

Establecimiento *in vitro*

En el caso de las cactáceas el material vegetal inicial más comúnmente utilizado son las semillas, las cuales son abundantes en el fruto y se desinfectan y establecen fácilmente con el empleo de Hipoclorito de sodio en concentraciones que varían entre 1.5 y 2.0%, las cuales se colocan en un medio de cultivo de germinación generalmente sin reguladores del

crecimiento y con el contenido de sales inorgánicas reducido entre un 25 y un 50%.

Autores como Quiala *et al.* (2003) destacan, que con el empleo de un medio de cultivo simple, que contenía el 50% de las sales Murashige y Skoog (1962) (MS), sin reguladores del crecimiento, lograron porcentajes de germinación del 91.4% durante la micropropagación de *Pilosocereus robinii*, un endémico de Cuba en peligro de extinción. Montalvo *et al.* (2004) durante la micropropagación de *Pilosocereus* sp., endémico de Santa Clara en peligro crítico de extinción, refieren porcentajes de germinación del 94.4% con el empleo de un medio de cultivo compuesto por el 25% de las sales MS. *Melocactus actinacanthus*, es otra especie endémica de Villa Clara, de la cual solo quedan tres ejemplares en condiciones de hábitat natural y durante su propagación *in vitro* autores como Quiala *et al.* (2004) refieren el estudio de diferentes concentraciones de sales MS (25, 50, 75%) en el medio de cultivo de germinación y destacan que los mayores valores (81.4%) se obtuvieron cuando se utilizó las sales MS al 25%.

Fase de multiplicación de los explantes

La aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos en la propagación de especies en peligro de extinción cobra mayor o menor importancia en dependencia del grado de conservación de la especie y de la disponibilidad de material vegetal de partida, ya que no se puede pasar por alto la posible variabilidad que puede introducir la multiplicación sucesiva de los explantes *in vitro*, es por ello que la estrategia radica en reducir al mínimo posible el número de subcultivos *in vitro*.

Por otro lado, la proliferación de nuevos brotes axilares se logra con la adición de citoquininas en el medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas laterales. Aunque los brotes en crecimiento son capaces de sintetizar pequeñas cantidades de citoquininas es conocido que esta es insuficiente para soportar el desarrollo y crecimiento *in vitro*. Por tal razón más del 85% de los medios de cultivo empleados en la micropropagación incluyen como suplemento alguna citoquinina.

El regulador del crecimiento más utilizado para la obtención de nuevos brotes en la familia cactáceae es la 6-bencilaminopurina (6-BAP). Diversos autores como Rodríguez (1995) en la propagación de *Melocactus holguinensis* señalan el empleo de 4.0 mg.l⁻¹ de este regulador del crecimiento combinado con 0.5 mg.l⁻¹ de ANA (ácido naftalenacético) para la fase de multiplicación, con lo cual obtuvo un coeficiente de 1.3-1.5 explantes.

Para la micropropagación de *Opuntia myclaea* y *Agave atrovirens*, dos especies suculentas, el desarrollo de yemas laterales se logra con la

eliminación de la dominancia apical y la aplicación de 6-BAP en el medio de cultivo (Escobar *et al.*, 1986).

En la especie *Turbincarpus pseudopectinatus*, una cactácea mexicana en peligro de extinción, el empleo de 2.0 mg.l⁻¹ de Benciladenina (BA) fue suficiente para la inducción de nuevos brotes (Arenas *et al.*, 2003).

Autores como Jiménez *et al.* (2003) destacan que durante la propagación *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* otra cactácea endémica de México en peligro de extinción, la mayor formación de brotes por explante (7.0 a 8.0) se obtuvo en un medio de cultivo con 2.0-3.0 mg.l⁻¹ de BA con nulas o bajas concentraciones de ANA.

Sotomayor *et al.* (2003) en la micropropagación de *Coryphantha elephantidens*, que es una cactácea amenazada y endémica del estado de Morelos en México, señalan que el mayor número de brotes (7.4 brotes por explante) se obtuvo cuando utilizaron 3.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP en el medio de cultivo a los 48 días de cultivo.

Quiala *et al.* (2003) destacaron durante la propagación *in vitro* de *Pilosocereus robinii*, una cactácea endémica cubana en peligro de extinción, que los mejores resultados en cuanto a multiplicación (2-2.3 brotes por explante) se obtuvieron cuando se utilizaron 2.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP en el medio de cultivo.

Montalvo (2004) señaló el empleo de 1.0 mg.l⁻¹ de 6 BAP para la propagación *in vitro* de *Pilosocereus* sp. una cactácea endémica de Santa Clara en peligro crítico de extinción.

Enraizamiento *in vitro*

Los cactus cultivados *in vitro* enraizan fácilmente al ser colocados en un medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento. Algunos autores señalan también el uso de auxinas como el ANA y el IBA (ácido indolbutírico).

Según Escobar *et al.* (1986) lograron el enraizamiento de explantes de *Opuntia amyclaea* y *Agave atrovirens* sin la adición de auxinas exógenas de modo que utilizaron para este fin un medio de cultivo simple con el 50% de las sales MS, sin reguladores del crecimiento.

Arenas *et al.* (2003) señalaron que el mejor enraizamiento durante la micropropagación de *Turbincarpus pseudopectinatus* se logró utilizando un medio de cultivo complementado con 0.01 mg.l⁻¹ de ANA.

Durante la propagación *in vitro* de *Ariocarpus bravoanus* el porcentaje de enraizamiento de tubérculos fue

cercano al 25%, las raíces obtenidas fueron vigorosas y de 4-8 en cada tubérculo cuando utilizaron un medio de cultivo MS con IBA (0-2 mg.l⁻¹) y ANA (0-1 mg.l⁻¹) (Gómez *et al.*, 2003).

Autores como Quiala *et al.* (2003) describieron el empleo de un medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento para el enraizamiento de los explantes de *Pilosocereus robinii*.

Durante la micropropagación de *Astrophytum myriostigma*, Jiménez *et al.* (2003) probaron tres tratamientos para el enraizamiento de brotes adventicios, utilizando diferentes concentraciones de ANA y el más efectivo fue el control sin reguladores del crecimiento donde enraizó el 100% de las plantas.

Montalvo (2004) destaca un 100% de enraizamiento de las plantas propagadas *in vitro* de *Pilosocereus* sp. cuando utilizó un medio de cultivo MS sin reguladores del crecimiento.

Fase de aclimatación

Esta es una de las fases más difíciles durante el proceso de propagación de las cactáceas ya que se requiere de un adecuado manejo de las condiciones de riego e iluminación. Cuando el riego es excesivo los pequeños cactus son afectados por pudriciones.

Los sustratos más utilizados han sido la materia orgánica, la zeolita, el estiércol vacuno con más de ocho meses de descomposición, fibra de coco y la vermiculita.

Quiala *et al.* (2003) refieren el empleo de un sustrato compuesto por 100% de estiércol vacuno con más de ocho meses de descomposición para la aclimatación de *Pilosocereus robinii* con lo cual se logró el 91.4% de supervivencia de las plantas.

Por otro lado Montalvo (2004) destacó el uso de un mezcla de 85% de materia orgánica y 15% de zeolita para la aclimatación de *Pilosocereus* sp.

Las pudriciones pueden evitarse utilizando una frecuencia de tres riegos por semanas y colocando una pequeña capa de dos a tres centímetros de espesor de zeolita o grava sobre la materia orgánica y sobre esta capa se realiza la siembra, de forma tal que el agua drene y no se mantenga alrededor de la base de la pequeña planta.

CONSIDERACIONES GENERALES

Las técnicas de cultivo de tejidos son una herramienta alternativa y eficaz de gran importancia para la recuperación de diferentes especies amenazadas, con lo que se contribuye a enfrentar los crecientes problemas de la pérdida de la biodiversidad. Estas técnicas pueden complementarse con otras que se

realizan en el cultivo *in situ* y cuya combinación pueden ser de gran importancia para la solución de crecientes necesidades. La aplicación sabia y adecuada de las técnicas biotecnológicas puede evitar o minimizar la posibilidad de la variabilidad genética en las plantas que se obtengan mediante la micropropagación, esto se puede lograr manipulando adecuadamente el material vegetal, empleando reguladores del crecimiento específicos que no sean propensos a provocar mutagénesis, así como el uso de los mismos en la cantidad adecuada y reducir al mínimo posible el número de subcultivo del material vegetal *in vitro*, entre otros factores.

Por otro lado se deben establecer estrategias teniendo en cuenta la situación en que se encuentre la especie amenazada, de modo que:

1) se realice simplemente la germinación de las semillas *in vitro* y no la multiplicación del material vegetal, en aquellos casos donde se disponga de cierta cantidad de individuos (situación no crítica).

2) pasar a multiplicar aquellas especies de las cuales se tengan materiales únicos o muy escasos, y al final del ciclo cuando las plantas se hayan desarrollado en su entorno natural realizar estudios de variabilidad genética y como requisito común para ambas estrategias, establecer líneas y propagar igual cantidad de individuos de cada una de estas líneas.

REFERENCIAS

- Alemán, S, Fuentes L, González G, Darias R (1993) Cultivo *in vitro* de una especie amenazada *Melocactus matanzanus* (Leon). Libro de resúmenes 3er Coloquio Internacional de Biotecnología de Las Plantas. Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. 20-22 de Junio. p. 5
- Arenas, T, Tonatiuh A, Monroy E, Mata R, Martín B, Jiménez A y Chávez G (2003) Regeneración *in vitro* de *Turbinicarpus pseudopectinatus*. XV Congreso Mexicano de Botánica. Conservación y Manejo de Recursos. Disponible en internet: <http://www.socbot.org.mx/disco/Resumen/temcos1.htm>
- Bewley, J D, Black M (1994) Seeds: Physiology of Development and Germination. Plenum Press, New York
- Borhidi, A, Muñiz O (1983) New name and species in the Flora of Cuba and Antilles III. Acta Bot. Acad. Sci. Hung. 29 (1): 181-215
- Cárdenas, E, Ojeda M C, Torres T E, Saenz E O (1993) Micropropagación of *Atrophytium capricorne* endangered cactus from N E Mexico. Botanic Gardens Micropropagation News 1: 6-9
- Clemente, M (1999) *In vitro* Culture (IVC) and Plant Conservation. En: Bowes B G (Ed) A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation, pp. 77-86. Manson Publishing, London
- Conway, W (1988) Can technology aid species preservation? En: Wilson E O (Ed) Biodiversity, pp. 263-268. National Academy Press. Washington DC
- Escobar, H A, Villalobos A, Villegas MA (1986) *Opuntia amyclaea* micropropagation by axillary proliferation. Plant Cell tissue & Organ Culture 7(3): 269-277

- Fay, M F, Bunn E, Ramsay M M (1999) *In vitro* Propagation. En: Bowes B G (Ed) A Color Atlas of Plant Propagation and Conservation, pp. 97-107. Manson Publishing. London
- Gómez, J, Romero R, Jiménez B, Monroy A (2003) En: Regeneración *in vitro* de *Ariocarpus bravoanus* Hernández & Anderson, especie endémica mexicana en peligro de extinción. XV Congreso Mexicano de Botánica. Conservación y Manejo de Recursos. Disponible en internet: <http://www.socbot.org.mx/disco/Resumen/re680m>
- González-Benito, M E, Martín C, Iriondo J M, Pérez C (1999) Conservation of the Rare and Endangered Plants Endemic to Spain En: Benson, E (Eds) Plant Conservation Biotechnology. pp. 251-264. Taylor & Francis. London
- Iriondo, J M, Pérez C (1999) Propagation from Seeds and Seed Preservation En: Bowes B G (Ed) A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation, pp. 46-57. Manson Publishing. London
- Iriondo, J M (2001) Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. Israel Journal of Plant Sciences 44: 115-123
- Jiménez, R, Mata R, Martín C y Chávez A (2003) Regeneración *in vitro* de *Astrophytum myriostigma* Lem. XV Congreso Mexicano de Botánica. Conservación y Manejo de Recursos. Disponible en internet: <http://www.socbot.org.mx/disco/Resumen/re46m>
- Lynch, P T (1999) Tissue Culture Techniques in *In vitro* Plant Conservation En: Benson E (Ed). Plant Conservation Biotechnology, pp. 41-62. Taylor & Francis. London
- Matthews, P (1999) Vegetative Propagation from Stem Cuttings, Leaves and Roots En: Bowes B G (ed) A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation, pp. 58-68. Manson Publishing. London
- Mc Comb, J A (1985) Micropropagation of the rare species *Stylidium coroniforme* and other *Stylidium* species. Plant Cell Tissue and Organ Culture 4: 151-158
- Mc Neely, J A, Miller K R, Reid W V, Mittermeier R A, Werner T B (1990) Conserving the World Biological Diversity. IUCN, WRI, CI, WWF-US, the World Bank, Gland, Suiza
- Montalvo, G (2004) Propagación *in vitro* de *Pilosocereus* sp. Tesis de maestría, pp. 53. Santa Clara, Cuba
- Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiol. Plant. 15:473-497
- Pence, V (1999) The Application of Biotechnology for the Conservation of Endangered Plants En: Benson E. (Ed). Plant Conservation Biotechnology, pp. 227-250. Taylor & Francis. London
- Prance, G T (1997) The Conservation of Botanical Diversity En: Maxted N, Ford-Lloyd B V, Hawkes J G (Eds) Plant Genetic Conservation. The *In Situ* Approach, pp. 3-14. Chapman & Hall. London
- Prance, G T (1997) The Conservation of Botanical Diversity En: Maxted N, Ford-Lloyd B V, Hawkes J G (Eds) Plant Genetic Conservation. The *in situ* Approach. pp. 3-14. Chapman & Hall. London
- Primack, R (2000) A primer of conservation Biology. En: Andrew D Sinauer (Ed) Conservation of the diversity, pp. 245-252. Sinauer associates, Inc. Publishers Massachusetts
- Primack, R, Rozzi R, Feinsinger P, Dinzo R, Massando F (2001) Fundamentos de conservación biológica. Perspectivas latinoamericanas En: Andrew D Sinauer (ed) Destrucción y degradación del hábitat, pp. 315-321. Sinauer associates, Inc. Publishers Massachusetts
- Quiala, E, Montalvo G, Matos J, Mederos R, De Feria M, Chávez M, Capote A, Pérez N (2004) Establecimiento *in vitro* de *Eugenia squarrosa*: una especie endémica de Santa Clara (Cuba) en peligro de extinción. Biotecnología Vegetal Vol. 4 (1): 49-53
- Quiala, E, Montalvo G, De Feria M, Matos J, Mederos R, Chávez M, Capote A, Pérez N (2003) Propagación *in vitro* de dos especies endémicas de Cuba en categoría de amenaza. V Taller Internacional sobre recursos fitogenéticos. FITOGEN'2003. CD ROM. ISBN 959-246-089-2
- Rodríguez, L E (1995) Cultivo *in vitro* de *Melocactus holguinensis*, Areces. Libro de Resúmenes. Avances en Biotecnología Moderna. Habana '95 (3): 11-34
- Schemske, D W, Husband B C, Ruckelshaus M H, Goodwillie C, Parker I M, Bishop J G (1994) Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. Ecology 75: 584-606
- Sotomayor, M, Arredondo G (2003) Regeneración *in vitro* de *Coryphantha elephantidens*. XV Congreso Mexicano de Botánica. Conservación y Manejo de Recursos. Disponible en internet: <http://www.colpos.mx/IRENAT/bot/botind.htm>
- Touchell, D H, Dixon K W (1999) *In vitro* preservation En: Bowes B G (Ed) A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation, pp. 108-118. Manson Publishing. London