

**ALMIDÓN DE PAPA, AGENTE GELIFICANTE ALTERNATIVO EN MEDIOS
DE CULTIVO PARA PROPAGACIÓN *in-vitro* DE LULO
Solanum quitoense Lam.**

**POTATO STARCH, AN ALTERNATIVE GELLING AGENT IN CULTURE
MEDIA FOR *in-vitro* PROPAGATION OF LULO *Solanum quitoense* L.**

Darío Martín G.¹, Oswaldo Cárdenas G.², Agobardo Cárdenas C.³

Fecha de recepción: Octubre 31 de 2012

Fecha de aceptación: Abril 22 de 2013

RESUMEN

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica ampliamente utilizada en propagación, con la desventaja del alto valor de los insumos utilizados para tal fin, entre estos, el agar que representa un alto porcentaje de los costos. En este trabajo, se evaluó la sustitución parcial de agar por almidón de papa variedad Diacol Capiro, en proporciones de 50, 45 y 40% en medio de cultivo para micropropagación de lulo *Solanum quitoense* Lam. Se observó que al aumentar la concentración del almidón de papa, se presenta una disminución en la consistencia del medio. Se encontró significancia estadística en la longitud de los explantes, arrojando que el mejor resultado fue en los medios gelificados con 60-40% de agar-almidón de papa, mientras que las otras variables analizadas no arrojaron resultados estadísticamente significativos. Finalmente se concluye que el almidón de papa puede ser un potencial sustituto como agente gelificante para medios de propagación vegetativa de lulo.

-
- 1 Estudiante de Química de Alimentos, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia. Semillero del grupo de investigación BIOPLASMA UPTC. dario.martin@uptc.edu.co.
 - 2 Profesor e investigador del Grupo de Investigación Química Física Molecular y Modelamiento Computacional (QUIMOL UPTC). Ph. D. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia
 - 3 Profesor e investigador del Grupo de Investigación Química Física Molecular y Modelamiento Computacional (QUIMOL UPTC). MS.c. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia.

Palabras clave: Agar, lulo *S. quitoense*, micropropagación vegetal, cambios morfológicos.

ABSTRACT

Plant tissue culture is a widely technique used in propagation, being a disadvantage the high cost of the culture media used specially that of the agar, that represents a high percentage of costs. In this work, we evaluated the partial replacement of agar for potato starch of Diacol Capiro variety, in proportions of 50, 45 and 40% in culture media for lulo micropropagation *Solanum quitoense* Lam. It was observed a decrease of media consistency with an increment of potato starch. Statistical significance was found in the length of the explants, getting the best result with a gelled mix of 60-40 (agar-potato starch); other variables analyzed were not statistically significant. Finally it is concluded that potato starch can be a potential substitute as a gelling agent for vegetative propagation of lulo in media cultures.

Key words: Agar, lulo *S. quitoense*, vegetal micropropagation, morphological changes.

INTRODUCCIÓN

Técnicas biotecnológicas como el cultivo de tejidos pueden utilizarse eficientemente en el sector agrícola y constituyen una alternativa interesante a los métodos tradicionales de propagación, ya que permiten obtener una gran cantidad de material vegetal libre de patógenos en un corto periodo de tiempo (Fasolo y Predieri, 1988); además de la posibilidad de mejorar genéticamente las especies.

Sin embargo, estas técnicas tienen un alto costo debido a los componentes de los medios de cultivo. El agar, agente solidificante de dichos medios, ha presentado una enorme sobre explotación, consecuencia de su alta demanda (Jain y Babbar, 2002) y ha hecho que sea cada vez más difícil su obtención, elevando así los precios (Romay *et al.*, 2006; Mohamed *et al.*, 2010). La necesidad de reducir costos en la preparación de medios de cultivo para propagación *in vitro* ha llevado a los científicos a experimentar con

nuevas sustancias que puedan ser utilizadas como agentes gelificantes, tal es el caso de almidones y gomas (Jain y Babbar, 2006).

Los almidones son polímeros naturales compuestos por amilosa y amilopectina, se han utilizado debido a sus propiedades espesantes y aglutinantes (Pacheco y Techeira, 2009). Tal es el caso del empleo de almidón de yuca para gelificar medios de cultivo en tomate Romay *et al.* (2006), *Musa* (Mbanaso, 2008), *Faidherbia albida* y *Uapaca kirkiana*, Moses *et al.* (2004), *Celosia sp* (Daud *et al.*, 2011). También se han empleado almidones de arroz (Gonzales y Silva 1999) maíz Zimmerman *et al.* (1995), papa y maíz Mohamed *et al.* (2010), sagú (Rodríguez y Hechevarría, 2006), ensete o bulla Mengesha *et al.* (2012), harina y sémola de papa Sharifi *et al.* (2010) como soportes en medios de cultivo para regeneración y propagación *in vitro*. Además, hay reportes de la utilización de algunas gomas como las guar y cassia (Lucyszyn *et al.*, 2005; 2006), la xantana (Jain y Babbar, 2011), y la gellan

(Chacón *et al.*, 2000; Afrasiab y Jafar, 2011; Ozel *et al.*, 2008).

Por lo anterior, los objetivos se orientaron a la evaluación de los cambios morfológicos en los explantes de lulo *S. quitoense* micropropagados, al sustituir parcialmente el agar, por almidón de papa como solidificante en los medios de cultivo.

METODOLOGÍA

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio del grupo de Investigación BIOPLASMA, de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, seccional Tunja, durante el periodo de marzo a julio de 2012, en condiciones que se describen en cada fase de estudio.

Preparación de los medios de cultivo: Para la preparación de los medios se empleó una composición de nutrientes descrita por Murashige y Skoog (1962), suplementado con 0.5mg/L de ácido indolbutírico. Como agentes solidificantes se utilizaron el almidón de papa variedad Diacol Capiro, con las características descritas en la tabla 1 y el agar bacteriológico, en combinaciones presentadas en la tabla 2. Luego se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1kgf/cm² de presión durante 20 minutos.

Tabla 1. Análisis proximales realizados al almidón de papa utilizado para gelificar los medios de cultivo para la propagación *in-vitro* de lulo *Solanum quitoense* Lam.

| Contenido de | Promedio * |
|---------------|--------------|
| Humedad | 6.96 ± 0.02 |
| Cenizas | 0.60 ± 0.03 |
| Fibra | 0.10 ± 0.01 |
| Grasa | 0.16 ± 0.02 |
| Proteína | 0.17 ± 0.00 |
| Carbohidratos | 92.01 ± 0.01 |

* Se presentan intervalos de confianza al 95% calculados con tamaño de muestra n = 3.

Evaluación de consistencia de los medios: La evaluación se realizó con la ayuda de una escala hedónica, con valores entre 1 y 10, siendo estos el menor y mayor valor; los tratamientos 2, 3 y 4 se compararon con el tratamiento 1 o control.

Siembra e incubación de explantes: En frascos de cultivo se sembraron cuatro segmentos nodales de lulo *S. quitoense* de aproximadamente 1cm de longitud y se mantuvieron a una temperatura aproximada de 25°C, sin fotoperiodo, con una intensidad luminosa aproximada de 100 μmol m⁻²s⁻¹. Los explantes de lulo fueron obtenidos en el laboratorio de BIOPLASMA de la UPTC.

Tabla 2. Porcentajes de las mezclas de agentes gelificantes utilizados para la propagación *in-vitro* de lulo *Solanum quitoense* Lam. El 100% corresponde a 7,5g/L.

| Tratamiento | % agar | % almidón de papa |
|-------------|--------|-------------------|
| 1 | 100 | 0 |
| 2 | 50 | 50 |
| 3 | 55 | 45 |
| 4 | 60 | 40 |

Evaluación de los efectos de la sustitución parcial de agar: Para evaluar la sustitución de agar por almidón de papa se comparó el número de hojas y nodos, la longitud de las plántulas, la inhibición de crecimiento y el número de explantes regenerados por cada tratamiento. Estos efectos se evaluaron para el primer subcultivo realizado.

Análisis estadístico: Se utilizó un diseño aleatorio, con cuatro tratamientos, con 6 repeticiones, cada una con 12 explantes. Para la evaluación de los efectos producidos por la sustitución parcial de agar por almidón de papa, se hizo la prueba ANOVA de un solo factor y test de rangos múltiples de Duncan (cuando fue necesario), con un nivel de significancia de p = 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de consistencia de los medios:

La sustitución parcial del agar, por almidón, disminuyó la consistencia de los medios de cultivo, debido a que el almidón posee menor capacidad gelificante (Gonzales y Silva, 1999). A medida que se aumenta el grado de sustitución del agar, los medios presentan una dureza menor comparada con la del testigo (Fig. 1), sin embargo, su consistencia es adecuada para mantener los explantes en buenas condiciones para el crecimiento, permitiendo el desarrollo de los brotes adventicios con un buen volumen radicular (Fig. 2), cumpliendo con su función, servir de soporte a los explantes.

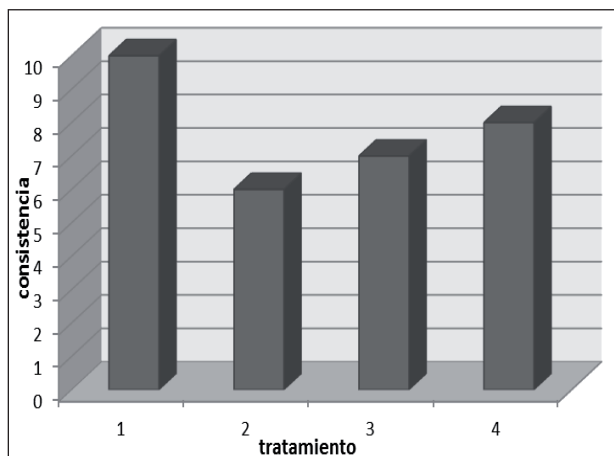


Figura 1. Consistencia de los medios de cultivo de los diferentes tratamientos para la propagación *in-vitro* de lulo *Solanum quitoense* Lam., según la escala hedónica

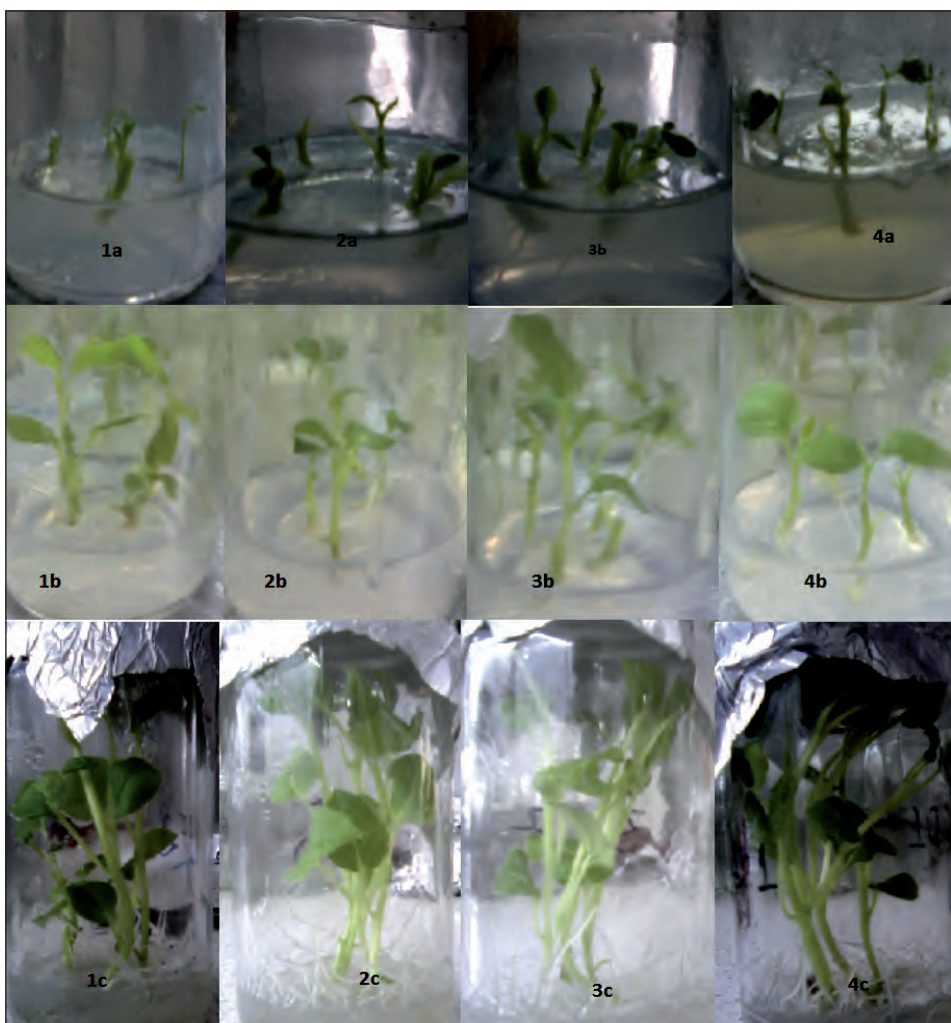


Figura 2. Crecimiento de los explantes de lulo a los 12 (a), 24 (b) y 40 (c) días de inoculados en el agente gelificante alternativo a base de almidón de papa.

Un comportamiento similar de los medios de cultivo fue encontrado por Sharifi *et al.* (2010), quienes observaron que la consistencia disminuía, al aumentar la sustitución de agar por mezclas de harina y almidón de papa.

Efectos de la sustitución parcial: Se evaluaron variables como inhibición de crecimiento, número de hojas y nodos, longitud y número de explantes regenerados.

Inhibición de crecimiento: En esta variable el análisis ANOVA no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p = 0.269$, Tab. 4), a pesar de que el tratamiento 3 presentó un mayor número de inhibiciones (Fig. 3), los tratamientos 2 y 4 presentaron medias más bajas que el tratamiento 1 (control), lo que muestra una muy buena reacción de los explantes ante la sustitución, ya que inhibieron en menor medida la regeneración de los segmentos nodales, descartando que la causa de la inhibición haya sido la sustitución parcial del agente gelificante. Resultados similares fueron encontrados por Romay *et al.* (2006) al cultivar segmentos nodales de yuca en medios gelificados con almidón modificado. Kuria *et al.* (2008), en micropropagación de segmentos nodales de papa (*S. tuberosum*), encontraron mejores resultados en medios gelificados con mezcla de agar-almidón de yuca respecto al agar solo.

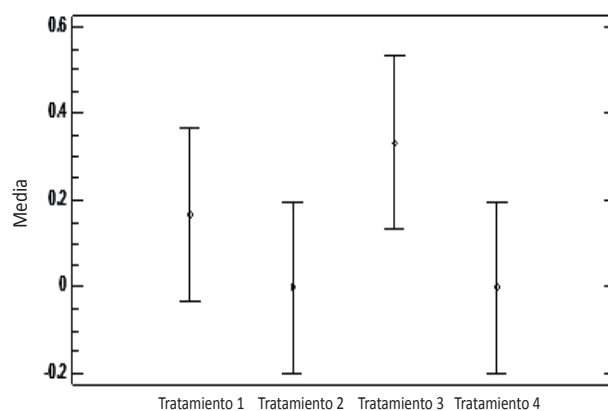


Figura 3. Medias para la variable inhibición de crecimiento de los diferentes tratamientos para la propagación *in-vitro* de lulo *Solanum quitoense* Lam., tamaño de muestra $n=6$.

Número de nodos y hojas: El número de hojas y nodos no resultó estadísticamente significativo ($p = 0.228$, Tab. 4), aunque el tratamiento 3 exhibiera una media menor (Fig. 4).

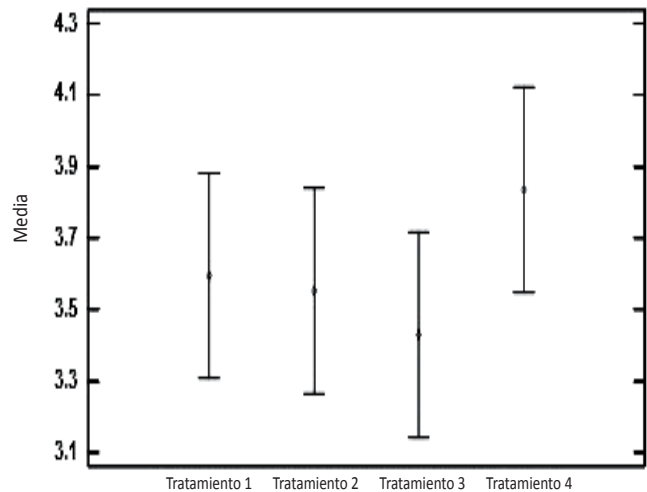


Figura 4. Medias para la variable número de hojas y nodos de los diferentes tratamientos para la propagación *in-vitro* de lulo *Solanum quitoense* Lam., tamaño de muestra $n=6$

Resultados similares fueron encontrados por Rodríguez y Hechavarría (2006), quienes no observaron diferencia estadística en el número de hojas en la micropropagación de explantes de *Orthosiphon aristus* y *Artemisia absintium*, cultivados en medios solidificados con mezclas de agar, harina de sagú y gel de *Aloe vera*. Sin embargo, Mohamed *et al.* (2010), reportaron diferencias significativas entre cada una de las mezclas de agar y almidón de papa utilizadas para medios de propagación de nodos de papa *S. tuberosum*. Mengesha *et al.* (2012) encontraron también que al modificar los medios de cultivo de micropropagación de *Vainilla planifolia*, se mejoraba la cantidad de nodos y hojas en los explantes. Es de esperar que cada especie de plántula se comporte de una manera diferente, por los requerimientos nutricionales y los rasgos metabólicos.

Longitud de los explantes. La longitud de los explantes presentó una diferencia significativa en el análisis de variancia ANOVA ($p = 0.020$, Tab. 4). En los tratamientos en donde se utilizó almidón de papa como agente gelificante parcial, la longitud de los explantes fueron mayores (tratamientos 2, 3 y 4), comparadas con el tratamiento testigo 1 (Fig. 5).

Este comportamiento encontrado se debe a la mejor absorción de los nutrientes por parte de la plántula Shafiri *et al.* (2010) potenciado por la menor consistencia y mayor difusión de los mismos en los medios de cultivo. Los almidones poseen menor poder gelificante, lo que genera medios de cultivo con menor dureza (Mbanaso, 2008), que promueve una mejor función de la parte radicular de la planta, posibilitando la elongación celular, que macroscópicamente se expresa como mayor longitud de los explantes.

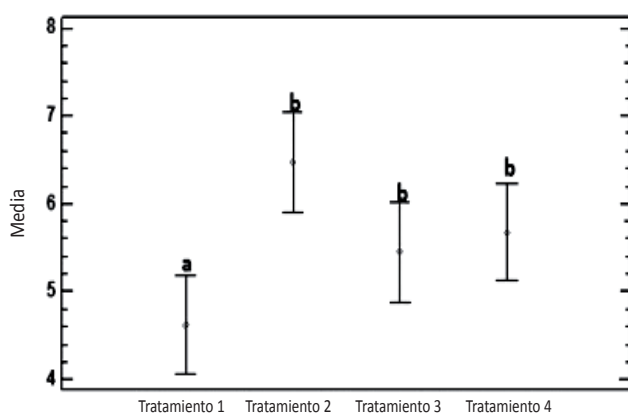


Figura 5. Promedios de la variable longitud de explantes de los diferentes tratamientos para la propagación *in-vitro* de lulo *Solanum quitoense* Lam., tamaño de muestra $n=6$ letras diferentes, demuestran diferencia estadística según en prueba de rangos múltiples de Duncan con nivel de significancia de 5%.

Respuestas similares fueron encontradas por Ozel *et al.*, (2008) al estudiar el efecto del isubgol en embriogénesis somática de *Nicotiana tabacum*;

Jain y Babbar (2011) en micropropagación de *A. lebbek* en medios gelificados con mezclas de isubgol-agar, goma guar- agar; Chacón *et al.* (2000) en micropropagación de *D. alata* y *D. trifida*, utilizando phytigel como soporte; Maliro y Lamerck, (2004) en propagación de *F. albida* y *U. kirkiana*, en medios gelificados con harina de yuca. Lucyszyn *et al.* (2005) encontraron resultados contrarios, al cultivar brotes de manzano (*Malus prunifolia* Borkh) en medios de cultivo gelificados con mezclas de goma agar-agar y goma cassia-agar.

Rebrote o regeneración de explantes. La eficiencia de los tratamientos analizados, en el rebrote o regeneración de los explantes no mostró diferencia significativa ($p = 0.055$, Fig. 6).

En un estudio realizado por Maliro y Lameck (2004), se evidenciaron resultados similares. Las mezclas de agar y almidón de yuca, utilizadas como solidificantes en la micropropagación de *F. albida*, arrojaron mayor número de segmentos nodales regenerados y mayor longitud de los mismos.

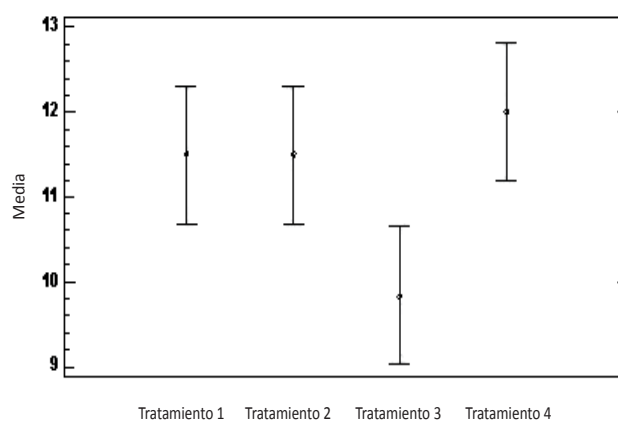


Figura 6. Medias para la variable número explantes regenerados de los diferentes tratamientos para la propagación *in-vitro* de lulo *Solanum quitoense* L., tamaño de muestra $n=6$.

Resultados encontrados por Daud *et al.* (2011) y Sharifi *et al.* (2010), contrastan, debido a que se encontraron diferencias significativas en la micropropagación de *Celosia sp.* y violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) en medios modificados con almidón de papa y harina de yuca como agentes solidificantes. Se infiere entonces que la plántula de lulo es menos sensible a los cambios en el medio o que se requiere un número mayor de subcultivos a analizar para detectar respuestas significativas.

Análisis de costos. Económicamente, los tratamientos en donde se realizó sustitución parcial del agar por almidón de papa como gelificante, hicieron que el costo/litro de medio de cultivo disminuyera en un rango de 15 a 19%, respecto al valor del tratamiento 1, gelificado con agar solamente.

En la tabla 3 se presenta detalladamente los costos por litro de los medios de cultivo en cada tratamiento. Se evidencia que la mayor disminución en pesos se encontró en el tratamiento 2, con un valor de 19%. Hay que tener en cuenta

que el valor de todos los nutrientes es constante (CO \$7558/l).

Tabla 3. Costos en pesos de un litro del medio de cultivo utilizando almidón de papa, como agente gelificante alternativo para la propagación *in-vitro* de lulo *Solanum quitoense* Lam.

| Tratamiento | Costo (CO\$/L) | Disminución de costos (%) |
|-------------|----------------|---------------------------|
| 1 | 12133 | 0 |
| 2 | 9851 | 19 |
| 3 | 10079 | 17 |
| 4 | 10367 | 15 |

Los resultados sugieren que, aunque no existió diferencia significativa en la mayoría de las variables analizadas, el tratamiento 4 (60% agar - 40% almidón de papa) fue el que presentó mejores resultados. Esta mezcla de agar almidón es un apropiado agente solidificante, pues solo se encontró diferencia estadística en la longitud de los explantes.

Tabla 4. Análisis de varianza de todas las variables analizadas en la evaluación del almidón de papa, como agente gelificante alternativo para la propagación *in-vitro* de lulo *Solanum quitoense* Lam.

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|---------------------------|--------------|-------------------|----|------------------|-------|-------|
| Longitud | Inter-grupos | 10.368 | 3 | 3.456 | 4.096 | 0.020 |
| | Intra-grupos | 16.877 | 20 | 0.844 | | |
| | Total | 27.245 | 23 | | | |
| Nodos y hojas | Inter-grupos | 1.100 | 3 | 0.367 | 1.569 | 0.228 |
| | Intra-grupos | 4.673 | 20 | 0.234 | | |
| | Total | 5.773 | 23 | | | |
| Inhibición de crecimiento | Inter-grupos | .458 | 3 | 0.153 | 1.410 | 0.269 |
| | Intra-grupos | 2.167 | 20 | 0.108 | | |
| | Total | 2.625 | 23 | | | |
| Explantes regenerados | Inter-grupos | 16.125 | 3 | 5.375 | 3.000 | 0.055 |
| | Intra-grupos | 35.833 | 20 | 1.792 | | |
| | Total | 51.958 | 23 | | | |

CONCLUSIONES

La consistencia de los medios de cultivo se vio afectada por la sustitución parcial del agar, pues el almidón de papa utilizado no posee las mismas características solidificantes. Sin embargo, esto no impidió el favorable desarrollo de los explantes. La sustitución parcial del agar por almidón de papa afectó significativamente la longitud de los explantes, en un primer sub-cultivo, mientras que no hubo efecto para el resto de variables evaluadas. Los datos obtenidos mostraron que una sustitución parcial del 40% en peso de agar, se logran mejores resultados en la micropropagación de explantes de lulo *S. quitoense*.

AGRADECIMIENTOS

La investigación fue posible gracias a la colaboración de los grupos de investigación BIOPLASMA UPTC y QUIMOL, de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia UPTC Sede Central.

BIBLIOGRAFÍA

AFRASIAB, H. Y JAFAR, R. 2011. Effect of different media and solidifying agents on callogenesis and plant regeneration from different explants of rice (*Oryza sativa* L) varieties super basmati and IRRI-6. Pakistan Journal of Botany. 43(1):487 - 501.

CHACÓN, A. G., SABORÍO, F., GÓMEZ, L., TORRES, S Y VALVERDE, R. 2000. El tipo de gelificante en el desarrollo in-vitro y la aclimatización de plantas de yampi (*D. trifida*) y ñame (*D. alata*). Agronomía costarricense. 24(2):57 - 64.

DAUD, N., MAT TAL, R., MOHD NOOR, N. N. Y ALIMON, H. 2011. Potential of alternative gelling agents in media for the *in vitro* micropropagation of *Celosia sp.* International Journal of Botany. 7(2):183 - 188.

DAUD, N., MAT TAL, R., MOHD NOOR, N. N. Y ALIMON, H. 2011. Provision of low cost media options for *in vitro* culture of *Celosia sp.* African Journal of Biotechnology 10(80):18349 - 18355.

FASOLO, F.M. Y PREDIERI, S. 1988. In vivo rooting of gf 655-2 peach rootstock and kiwi cv. "Hayward" Microcuttings. Acta Horticultura. 227: 500 - 503.

GONZÁLEZ, P. O. S. Y SILVA, P. J. J. 1999. Empleo de diferentes agentes gelificantes en el cultivo de tejidos vegetales. Centro Agrícola. 26(1):84 - 85.

JAIN, N. Y BABBAR, S. B. 2002. Gum katira - a cheap gelling agent for plant tissue culture media. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 71: 223 - 229.

JAIN, R Y BABBAR, S. B. 2006. Xanthan gum: an economical substitute for agar in plant tissue culture media. Plant Cellular Reproduction. 25: 81 - 84.

JAIN-RAINA, R. Y BABBAR, S. B. 2011. Evaluation of blends of alternative gelling agents with agar and development of xanthagar, a gelling mix, suitable for plant tissue media. Asian Journal of Biotechnology. 3(2):153 - 164.

KURIA, P., DEMO, P., NYENDE, A. B., Y KAHANGI, E. M. 2008. Cassava starch as an alternative cheap gelling agent for the *in vitro* micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). African Journal of Biotechnology. 7(3): 301 - 307.

- LUCYSZYN, N., QUOIRIN, M., ANJOS, A., Y SIERAKOWSKI, M.R. 2005. Blends of Agar/Galactomannan for Marubakaido Apple Rootstock Shoot Proliferation. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 15(2):146 - 150.
- LUCYSZYN, N., QUOIRIN, M., KOEHLE, H.S., REICHER, F. Y SIERAKOWSKI, M.-R. 2006. Agar/galactomannan blends for strawberry (*Fragaria x ananassa Duchesne*) cv. Pelican micropropagation. *Scientia Horticulturae*. 107: 358 - 364.
- MALIRO, M.F y LAMECK, G. 2004. Potential of cassava flour as a gelling agent in media for plant tissue cultures. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/AJb/abstracts/abs2004/Apr/Maliro%20and%20Lameck.htm>; consulta: Octubre, 2012.
- MBANASO, E.N.A. 2008. Effect of multiple subcultures on *Musa* shoots derived from cassava starch-gelled multiplication médium during micropropagation. *African Journal of Biotechnology*. 7(24):4491 - 4494.
- MENGESHA, A., AYENEW, B., GEBREMA-RIAM, E. Y TADESSE, T. 2012. Micro-Propagation of *V. planifolia* Using Enset (*Ensete ventricosum* (Welw, cheesman)) Starch as a Gelling Agent. *Current Research Journal of Biological Sciences*. 4(4):519 - 525.
- MOHAMED, M. A. H., ALSADON, A. A. Y AL MOHAIDIB, M. S. 2010. Corn and potato starch as an agar alternative for *S. tuberosum* micropropagation. *African Journal of Biotechnology*. 9(1):012 - 016.
- MOSES F. A., MALIRO. Y LAMECK, G. 2004. Potential of cassava flour as a gelling agent in media for plant tissue cultures. *African Journal of Biotechnology*. 3(4):244 - 247.
- MURASHIGE, T. Y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiological Plant*. 15: 473 - 497.
- OZEL, C. A., KHAWAR, K.A. Y ARSLAN, O. 2008. A comparison of the gelling of isubgol, agar and gelrite on *in vitro* shoot regeneration and rooting of variety Samsun of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Scientia Horticulturae*. 117: 174 - 181.
- PACHECO DE DELAHAYE, E. Y TECHEIRA, N. 2009. Propiedades químicas y funcionales del almidón nativo y modificado de ñame (*D. alata*). *Interciencia*. 34(4):280 - 285.
- RODRÍGUEZ, G. H. Y HECHEVARRÍA, S. I. 2006. Gel de *Aloe vera* (L.) N.L. Burm. y harina de sagú como soporte sólido de medio de cultivo para plantas medicinales. *Revista Cubana Plantas Medicinales*. 11(1):1 - 5.
- ROMAY, G., MATHEUS, J., GERLTS, A., RUEDA, R. Y SANTANA, M.A. 2006. Almidón modificado de yuca como sustituto económico del agente solidificante para medios de cultivo de tejidos vegetales. *Interciencia*. 3(9):686 - 689.
- SHARIFI, A., MOSHTAGHI, N. Y BAGHERI, A. 2010. Agar alternatives for micropropagation of African violet (*S. ionantha*). *African Journal of Biotechnology*. 9 (54):9199 - 9203.
- ZIMMERMAN, R. H., BHARDWAJ, S.V. Y FORDHAM, M. I. 1995. Use of starch-gelled medium for tissue culture of some fruit crops. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 43: 207 - 213.