

EL TIPO DE GELIFICANTE EN EL DESARROLLO *in vitro* Y LA ACLIMATIZACION DE PLANTAS DE YAMPI (*Dioscorea trifida*) Y ÑAME (*Dioscorea alata*)¹

Ana Gabriela Chacón*, Francisco Saborío²/*, Luis Gómez*, Sergio Torres*, Roberto Valverde*

Palabras clave: ñame, yampí, aclimatización, *in vitro*, gelificante

RESUMEN

El yampí y el ñame se cultivan en Costa Rica primordialmente con fines de exportación; sin embargo, su producción se ve seriamente limitada por la falta de semilla libre de plagas y enfermedades. La producción *in vitro* de semilla representa una alternativa a esta problemática, pero este proceso debe a su vez ser optimizado. El presente trabajo evaluó el efecto de 2 gelificantes sobre el crecimiento *in vitro* y en invernadero de plantas de *D. trifida* y *D. alata*. Se encontró que, en general, el crecimiento *in vitro* y en invernadero de las plantas se ve favorecido en ambas especies por el uso del Phytigel® a 1.3 y 1.8 g/L. Además, el subcultivo de plantas de *D. alata* con síntomas de hiperhidricidad en medio solidificado con agar redujo considerablemente estos síntomas.

ABSTRACT

The gelling agent type on *in vitro* and greenhouse growth of yams (*Dioscorea trifida* and *D. alata*). Yams are cultivated in Costa Rica mainly as export products. However, their production is seriously limited by lack of high quality seed. *In vitro* micropropagation represents a solution to this problem, but this technology requires to be optimized before it can be implemented. In this study, the effect of the type and concentration of two gelling agents was evaluated during *in vitro* and acclimatization of *D. trifida* and *D. alata*. In general, it was found that growth was favored by the use of Phytigel® (1.3 and 1.8 mg/L) over agar, for both *in vitro* and greenhouse conditions. Subculturing of hyperhydric *D. alata* plants in agar-solidified medium reduced the problem significantly.

INTRODUCCION

El ñame (*Dioscorea alata*) y el yampí (*D. trifida*) son originarios de las selvas del sureste de Asia, la región boscosa de Africa occidental y la Cuenca Amazónica. Estas especies se caracterizan por tener un tallo rizomatoso o subterráneo

el cual emite tallos aéreos, órganos de reserva y raíces (León 1978).

Su producción comercial es de gran importancia alimenticia en países en desarrollo de las regiones tropicales y subtropicales de Africa, Asia y el Caribe (Ammirato 1984). En Costa Rica, su producción es primordialmente con fines

1/ Recibido para publicación el 31 de octubre del 2000.
2/ Autor para correspondencia.

* Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica.

de exportación a los Estados Unidos, Europa y el Caribe, donde estos productos son consumidos por comunidades de origen tropical. El volumen total exportado de enero a setiembre de 1999 de *D. trifida* fue de 531.0 TM y el de *D. alata* de 15.495 TM, con un valor FOB superior a los 8.5 millones de dólares.

Tradicionalmente el ñame se ha propagado asexualmente a partir de rizomas (enteros o fragmentados) o de cortes de tallo (esquejes); sin embargo, estos métodos son ineficientes para el abastecimiento de material propagativo y no permiten una buena calidad fitosanitaria del mismo (Forsyth y Van Standen 1982). Las técnicas de propagación *in vitro* han resultado de gran utilidad para la solución de estos problemas, ya que permiten una rápida multiplicación de material libre de plagas y enfermedades (Ammirato 1984).

En la etapa de aclimatización de plantas micropropagadas han sido observadas pérdidas, las cuales son atribuidas principalmente a la calidad de las plantas producidas *in vitro*, que son por lo general, excesivamente elongadas, de tejido muy suculento y en algunos casos presentan síntomas similares a los descritos para plantas hiperhidratadas. Así mismo, problemas de manejo, principalmente en el control de la humedad durante el proceso de aclimatización, puede aumentar las pérdidas en ésta etapa.

El objetivo del presente trabajo fue incrementar la sobrevivencia de las plantas de *D. trifida* y *D. alata* durante la fase de aclimatización, mediante la manipulación de las condiciones de cultivo *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

El material inicial fueron plántulas de *Dioscorea trifida* y *D. alata* establecidas *in vitro* y con 4 semanas de cultivo luego de su última transferencia. A estas plántulas se les eliminó el nudo basal, se individualizaron los nudos restantes y se colocaron en los respectivos tratamientos. Los tra-

tamientos consistieron en el tipo y la dosis de gelificante: sin gelificante (medio líquido), Phytigel® a 1.3, 1.8 y 2.3 g/L y agar a 7.0, 8.0 y 9.0 g/L. Las plántulas se subcultivaron en un medio de Murashige y Skoog (1962) (MS) suplementado con mio-inositol (100 mg/L), tiamina (0.5 mg/L), ácido nicotínico (0.5 mg/L), piridoxina (0.5 mg/L) y sacarosa (4%). El pH fue ajustado a 5.9 antes de autoclavar el medio. Las plántulas se cultivaron a 25°C con un fotoperíodo de 12 h.

Para el estudio se sembraron 80 plántulas para cada tratamiento de las cuales se evaluaron 40 después de 7 semanas de crecimiento *in vitro* y las otras 40 a las 4 semanas después del trasplante al invernadero. En las pruebas *in vitro* y en las de invernadero se utilizó un diseño irrestricto al azar con 4 repeticiones por tratamiento por evaluación. Cada repetición estuvo constituida por 10 plantas. Se hizo un análisis de variancia (ANDEVA) y se llevó a cabo una prueba de diferencia mínima significativa (DMS) para verificar diferencias entre tratamientos.

En la primera evaluación se midió el número de hojas, la altura, el peso fresco y el peso seco, así como el estado visual (hiperhidratado/no hiperhidratado). Se consideraron plantas hiperhidratadas aquellas que presentaban una coloración más pálida, translúcida y de aspecto quebradizo. El resto de las plántulas fueron transferidas al invernadero y sembradas en un sustrato esterilizado, compuesto por fibra de coco y suelo en proporción 1:1. Las plántulas se cubrieron con una tela porosa para protegerlas de la deshidratación y los cambios bruscos de temperatura y se colocaron en un túnel de polietileno. Se regaron diariamente y fueron asperjadas semanalmente con una solución de Kilol (1 ml/L) + Fosnutren (1 ml/L). Las condiciones en el invernadero durante los meses en que se llevó a cabo los ensayos fueron de 30-35°C (temperatura diurna) y 20-25°C (temperatura nocturna), con una humedad relativa de 70-90%.

A las 4 semanas de permanencia de las plántulas en el invernadero se llevó a cabo la segunda evaluación, se tomó 40 plántulas por tratamiento y se evaluó el porcentaje de sobrevivencia de las plántulas para cada uno de los tratamientos, y nuevamente el número de hojas, la altura, el peso fresco y el peso seco.

Se determinó el crecimiento de las plántulas durante estas 4 semanas mediante el cálculo del porcentaje de incremento de cada una de las variables evaluadas según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de incremento: } \frac{V_2 - V_1}{V_1} * 100$$

Donde:

V_1 : valor al momento de la remoción de las plantas del medio de cultivo.

V_2 : valor después de 4 semanas de aclimatación.

RESULTADOS

Crecimiento de las plántulas *in vitro*

El tipo y concentración de gelificante utilizado durante el cultivo *in vitro* tuvo influencia sobre el desarrollo de las plantas de *D. trifida* y *D. alata*, concentraciones crecientes de los gelificantes causan un cambio aparente del crecimiento (Figuras 1a y 1b).

Al medir las variables de crecimiento se encontró, en ambas especies, diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los 2 gelificantes evaluados, en lo que respecta a las variables altura, peso fresco, peso seco y porcentaje de materia seca de las plantas (Cuadro 1). Los valores de altura, peso fresco y peso seco fueron superiores en los tratamientos en los que se utilizó el Phytigel® como gelificante, en comparación con los de agar. Contrario a lo anterior, los tratamientos con agar presentaron valores superiores a los de Phytigel® en cuanto al porcentaje de materia seca en los tejidos de las plántulas durante el cultivo *in vitro* (Cuadro 1).

Al evaluar el efecto de las dosis de cada uno de los gelificantes en *D. trifida*, se encontró que hubo diferencias en las variables altura, peso fresco y peso seco para ambos gelificantes y en el número de hojas solo para el agar. En *D. alata* hubo diferencias en las variables de peso fresco, peso seco y porcentaje de plantas hiperhidratadas con el Phytigel® y en el número de hojas, altura y porcentaje de materia seca con el agar (Cuadro 1).

Los mayores valores para las variables peso fresco y peso seco, en *D. trifida* se obtuvieron con los tratamientos de Phytigel® 1.3 y 1.8 g/L, mientras que en *D. alata* el mayor valor fue con 1.3 g/L de Phytigel® aunque este valor no fue diferente ($P \leq 0.05$) a 1.8 g/L pero si diferente a las demás concentraciones en lo que respecta a las variables peso fresco y peso seco. Con el agar no hubo diferencias significativas entre las 3 dosis para las variables peso fresco y peso seco (Cuadro 1).

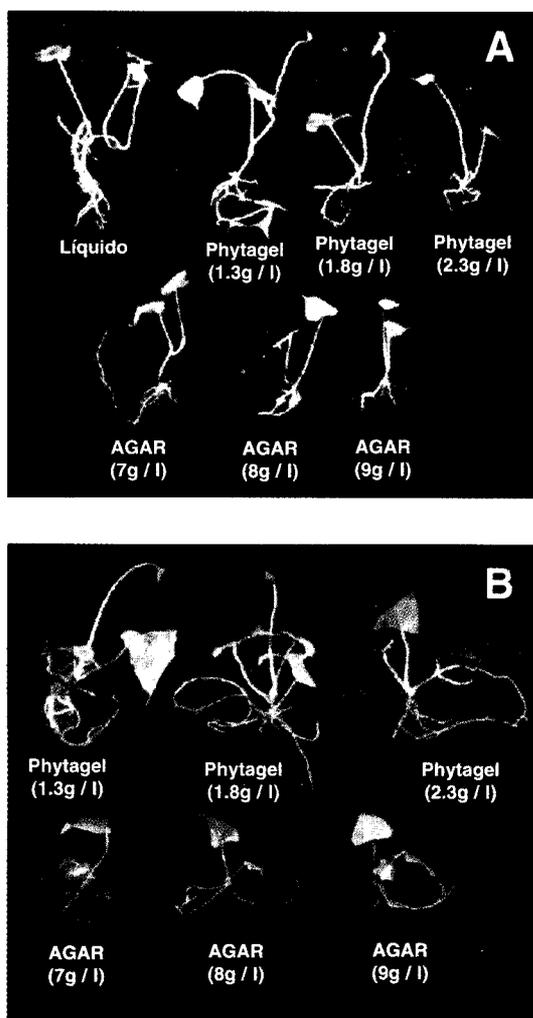


Fig. 1. Apariencia de las plantas de *D. trifida* (A) y *D. alata* (B) producidas *in vitro* con diferente tipo y concentración de gelificante al momento de su remoción del cultivo (7 semanas de edad).

Solo en *D. alata* se observaron síntomas asociados al fenómeno de hiperhidricidad y su incidencia fue mayor conforme disminuyó la dosis del gelificante. En esta especie se observó una correlación lineal inversa ($r=-0.91$) entre el porcentaje de acumulación de materia seca de las

plantas y el porcentaje de plantas con síntomas de hiperhidricidad (Cuadro 1).

Tanto en *D. trifida* como en *D. alata*, un alto porcentaje de las microestacas cultivadas en medio líquido no se desarrollaron, por lo que este tratamiento debió ser eliminado del ensayo.

Cuadro 1. Efecto del gelificante sobre el desarrollo *in vitro* de las plantas de *D. trifida* y *D. alata* (7 semanas de cultivo).

Tratamiento	Número de hojas	Altura (cm)	Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)	Materia seca (%)	Plantas hiperhidratadas*(%)
<i>D. trifida</i> **						
Phytigel (1.3 g/L)	2.425ab	6.610a	350.30a	24.38a	7.00%c	0%
Phytigel (1.8 g/L)	2.150b	6.395ab	365.93a	25.25a	7.12%bc	0%
Phytigel (2.3 g/L)	2.275ab	5.750bc	220.43b	16.85b	7.90%abc	0%
Agar (7 g/L)	2.525a	4.662de	188.65b	16.55b	8.72%a	0%
Agar (8 g/L)	2.275ab	4.947cd	186.20b	14.95b	8.05% ab	0%
Agar (9 g/L)	2.125b	3.952e	108.80c	8.57c	7.90%abc	0%
<i>D. alata</i>						
Phytigel (1.3 g/L)	3.37ab	4.137a	531.45a	37.32a	7.05%cd	82%a
Phytigel (1.8 g/L)	3.425ab	3.975a	414.57ab	30.00ab	7.18%cd	62%b
Phytigel (2.3 g/L)	3.275b	3.792a	345.57b	26.15bc	7.58%c	28%c
Agar (7 g/L)	2.925b	2.677bc	158.07c	13.10d	8.40%b	12%d
Agar (8 g/L)	3.125b	2.380c	180.12c	16.40d	9.10%a	5%d
Agar (9 g/L)	4.025a	3.163b	209.32c	19.11cd	9.15%a	5%d

* Plantas con síntomas visuales de hiperhidratación: aspecto translúcido y coloración pálida.

** Análisis estadístico en ambas especies es independiente.

Letras iguales en una misma columna no son diferentes significativamente al $P \leq 0.05$.

Crecimiento de las plántulas en invernadero

El desarrollo de las plántulas luego de un total de 11 semanas de cultivo (7 semanas *in vitro* y 4 semanas en el invernadero) varió de acuerdo al tipo y concentración de gelificante utilizado durante la etapa de cultivo *in vitro* (Cuadro 2).

Al comparar ambos gelificantes, en *D. trifida* hubo diferencias en las variables número de hojas, altura, peso fresco y peso seco y en *D. alata* en las variables altura, y peso fresco (Cuadro 2).

En *D. trifida* el uso de dosis crecientes de Phytigel® afectó negativamente el número de hojas, el peso fresco y el peso seco; la altura y

el porcentaje de materia seca no mostraron diferencias. Con el agar hubo diferencias entre las dosis solo en las variables número de hojas y altura. Los mayores valores se obtuvieron con 1.3 y 1.8 g/L de Phytigel® para las variables número de hojas, altura, peso fresco y peso seco. En el caso de *D. alata* no se observó un efecto entre las dosis de cada uno de los gelificantes (Cuadro 2).

Al evaluar el crecimiento como el porcentaje de incremento durante el período de cultivo en invernadero, se encontró diferencias entre los 2 gelificantes y entre las dosis de estos (Cuadro 3).

Cuadro 2. Características de las plantas de *D. trifida* y *D. alata* producidas *in vitro* con diferente tipo y concentración de gelificante, después de 4 semanas de haberse transplantado al invernadero.

Tratamiento	Número de hojas	Altura (cm)	Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)	Materia seca (%)
<i>D. trifida*</i>					
Phytigel (1.3 g/L)	3.725a	8.043a	685.50a	57.50a	9.25%a
Phytigel (1.8 g/L)	3.675a	7.925a	559.00abc	49.75ab	8.75%ab
Phytigel (2.3 g/L)	3.150bc	7.157ab	405.75cd	37.50bc	9.00%ab
Agar (7 g/L)	3.600ab	6.172b	456.00bcd	42.75abc	9.25%a
Agar (8 g/L)	3.425abc	6.317b	408.50cd	36.75bc	9.00%ab
Agar (9 g/L)	3.075c	4.752c	278.50d	24.75c	8.75%ab
<i>D. alata</i>					
Phytigel (1.3 g/L)	4.700a	5.498a	604.75a	50.50a	8.2%a
Phytigel (1.7 g/L)	4.250a	5.332a	550.25a	49.00a	8.8%a
Phytigel (2.3 g/L)	4.275a	5.285a	546.25a	52.00a	9.3%a
Agar (7 g/L)	4.300a	4.385b	314.75b	27.00a	8.5%a
Agar (8 g/L)	4.125a	4.075b	333.00b	28.64a	8.6%a
Agar (9 g/L)	4.225a	4.302b	346.75b	30.50a	8.8%a

* El análisis estadístico en ambas especies es independiente.
Letras similares en una misma columna no son diferentes significativamente al $P \leq 0.05$.

Cuadro 3. Efecto del tipo y concentración de gelificante utilizado durante el desarrollo *in vitro* de plantas de *D. trifida* y *D. alata*, sobre su porcentaje de sobrevivencia y porcentaje de crecimiento durante las primeras 4 semanas posteriores a su remoción del cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Sobrevivencia	Crecimiento			(% incremento*)
		Número de hojas	Altura	Peso fresco	
<i>D. trifida**</i>					
Phytigel (1.3 g/L)	100%	54.40%ab	22.10%a	80.85%bc	135.08%ab
Phytigel (1.8 g/L)	100%	70.68%a	24.86%a	55.05%c	96.46%b
Phytigel (2.3 g/L)	100%	39.79%b	25.79%a	87.92%bc	119.53%ab
Agar (7 g/L)	100%	42.73%b	33.11%a	145.84%ab	161.27%ab
Agar (8 g/L)	99%	51.89%ab	27.68%a	118.38%abc	143.17%ab
Agar (9 g/L)	100%	45.86%b	23.77%a	158.45%a	192.89%a
<i>D. alata</i>					
Phytigel (1.3 g/L)	95%b	40.63%ab	32.96%b	22.23%b	39.67%a
Phytigel (1.8 g/L)	100%a	30.10%ab	35.69%b	37.14%ab	76.17%a
Phytigel (2.3 g/L)	98%ab	31.43%ab	39.57%b	63.01%ab	100.74%a
Agar (7 g/L)	98%ab	47.69%a	64.70%ab	111.06%a	107.70%a
Agar (8 g/L)	98%ab	33.03%ab	74.69%a	89.26%ab	74.63%a
Agar (9 g/L)	92%b	13.46%b	37.40%b	72.31%ab	65.67%a

* Porcentaje de incremento con respecto al valor al momento de la remoción del cultivo *in vitro*.

** Análisis estadístico en ambas especies es independiente.

Letras similares en una misma columna no son diferentes significativamente al $P < 0.05$.

En el caso de *D. trifida* hubo diferencias entre los gelificantes para las variables número de hojas, peso fresco y peso seco, mientras que en *D. alata* fue para las variables porcentaje de sobrevivencia, altura y peso fresco (Cuadro 3).

En cuanto a las dosis de Phytigel®, en *D. trifida*, se encontró una diferencia significativa solo para la variable número de hojas (Cuadro 3) mientras que con agar no hubo diferencias. Para *D. alata*, con Phytigel® se observó diferencias significativas solo para la variable porcentaje de sobrevivencia, mientras que con las distintas dosis de agar hubo diferencias en las variables número de hojas y altura (Cuadro 3).

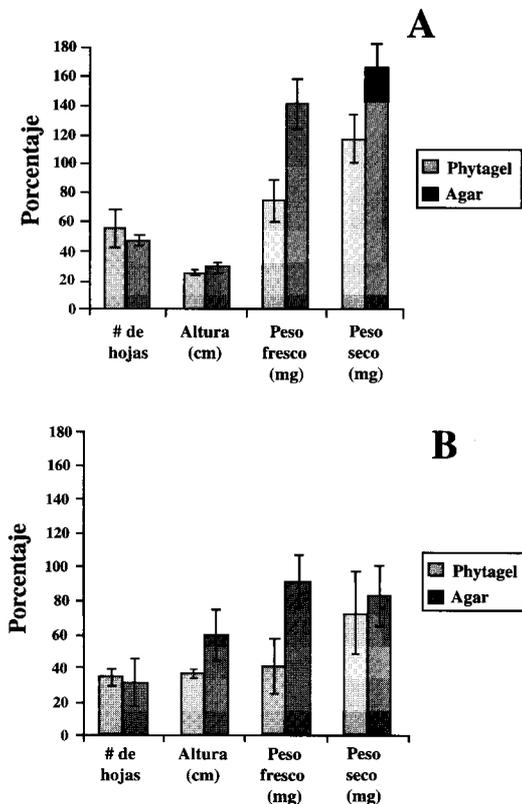


Fig. 2. Efecto del tipo de gelificante sobre el crecimiento de plantas de *D. trifida* (A) y *D. alata* (B) durante las 4 semanas posteriores a su remoción del medio de cultivo. *Las barras indican la desviación estándar.

Al comparar el efecto individual del gelificante se observó un mayor crecimiento *in vitro* con el Phytigel® (Cuadro 1), pero un mayor crecimiento en el invernadero de las plantas que habían sido cultivadas en agar (Figura 2). Sin embargo, el crecimiento total después de 11 semanas fue mayor en las plantas que fueron cultivadas en Phytigel® en las variables altura y peso fresco para ambas especies (Cuadro 2) pero, la diferencia en crecimiento de las plantas entre ambos gelificantes a las 11 semanas de cultivo fue menor que la diferencia a las 7 semanas de cultivo.

DISCUSION

Efecto del gelificante sobre el crecimiento *in vitro*

En cultivos como el *Pinus radiata* (Nairn et al. 1995) y la frambuesa (resultados no publicados) se ha demostrado el efecto regulador del agente gelificante sobre el crecimiento de la planta *in vitro*.

Estas diferencias en torno al crecimiento de las plantas se podrían deber al efecto que el tipo de gelificante ejerce sobre el potencial mátrico del medio de cultivo. Los resultados obtenidos demostraron una mayor acumulación de agua en los tejidos de las plantas cultivadas en medio solidificado con Phytigel® (Cuadro 1), lo cual parece ser evidencia de un menor potencial mátrico en los tratamientos con este gelificante en comparación con los de agar (a las dosis evaluadas). Esta mayor absorción de agua, posiblemente, favoreció la absorción de los nutrientes contenidos en el medio de cultivo, permitiendo así el mayor crecimiento de las plantas observado con el Phytigel® (Cuadros 1 y 2).

Por su parte, Nairn et al. (1995) atribuyen los efectos negativos del agar sobre el crecimiento de las plántulas de *Pinus radiata* a la constitución química del gelificante y no a sus propiedades físicas. Estos investigadores estudiaron las diferentes fracciones del agar y demostraron la existencia de un componente "tóxico" responsable de los efectos negativos sobre el crecimiento de las plantas.

Efecto del gelificante sobre la hiperhidratación

El tipo de gelificante también afectó en *D. alata* la incidencia de síntomas de apariencia viárida de las plantas, coloración verde pálido de las hojas y tejidos quebradizos que se asociaron con el fenómeno de la hiperhidratación (Singha et al. 1990). En *D. alata* el uso de agar disminuyó considerablemente la incidencia de los síntomas, lo que se suma a la evidencia encontrada en varias especies como pino, frambuesa y manzana, sobre la efectividad del uso de agar en el control de la hiperhidratación (Nairn et al. 1995, Marga et al. 1997). Al respecto, Nairn et al. (1995) y Marga et al. (1997) lograron determinar que esta propiedad del agar, en *Pinus radiata*, es consecuencia de un componente químico del gelificante pero que no ha sido caracterizado claramente.

Por otra parte, también se observaron diferencias en cuanto a la incidencia de los síntomas de hiperhidratación con respecto a la concentración de gelificante utilizada, tanto en agar como en Phytigel® (Cuadro 1): a mayor concentración de gelificante menor fue la incidencia de plántulas con síntomas de hiperhidratación. Estos resultados coinciden con lo afirmado por Hempel (1985) y Ziv (1990) con respecto al efecto del potencial mátrico del medio de cultivo sobre la morfogénesis *in vitro* (Singha et al. 1990, Williams y Taji 1991 y Brand 1993).

Contrario a lo esperado, los tratamientos que presentaron alta incidencia de plantas con síntomas de hiperhidratación no mostraron una menor tasa de sobrevivencia al trasplante al invernadero, lo cual es común en plantas hiperhidratadas (Ziv 1990, Preece y Sutter 1990). Los resultados observados podrían explicarse de varias formas: primero, los síntomas observados no correspondían al de plantas hiperhidratadas y segundo, que los síntomas si correspondían, pero que existen diferentes grados de hiperhidratación y según su magnitud las plantas son o no capaces de adaptarse a las condiciones *ex vitro*. Paques y Boxus (1987) y Ziv (1986), mencionados por Ziv (1990), afirman que la hiperhidratación involucra una gran cantidad de factores que podrían expresarse en varios grados de morfogénesis

anormal de acuerdo a las condiciones de cultivo y a la especie estudiada.

En el caso específico del presente estudio, se considera la segunda explicación como la más probable ya que las plantas de *D. alata* mostraban síntomas claros de hiperhidratación y se demostró que poseían cantidades significativamente mayores de agua en los tejidos que las plántulas que no mostraban estas características (Cuadro 1), lo cual es un síntoma típico de este fenómeno. Se demostró además que el estado de hiperhidricidad en que se encontraban era reversible (Cuadro 1). En adición, en observaciones de pruebas paralelas se encontró que solo si se tenía un estricto control de la humedad relativa en las camas de aclimatación, la muerte de plantas en esta etapa se reducía significativamente (manuscrito en preparación), lo que evidencia que las plantas se encontraban en un estado no óptimo, que podría ser asociado al fenómeno de hiperhidricidad.

Efecto del gelificante sobre el crecimiento en invernadero

Uno de los efectos más sobresalientes observados al remover las plantas del cultivo *in vitro*, fue la mayor tasa de crecimiento que presentaron las plantas producidas en medio de cultivo con agar (Cuadro 3). Este comportamiento podría estar relacionado con una mejor adaptabilidad de estas plantas a las condiciones de invernadero.

Las plantas cultivadas *in vitro* comúnmente muestran problemas de marchitamiento cuando son sacadas de los frascos de cultivo, lo que resulta en tasas de sobrevivencia bajas (Preece y Sutter 1991), debido a que estas no desarrollan una cutícula adecuada y la actividad estomática se ve reducida por la alta humedad del frasco de cultivo. Por esta razón las plantas deben pasar por un período de aclimatación, antes de transferirse a las condiciones de invernadero y campo, que les permita recuperar su estado normal. Tal parece que las plantas cultivadas en agar mantuvieron una condición de humedad menor o un potencial hídrico mayor que les permitió adaptarse a las condiciones *ex vitro* en un tiempo menor e iniciar su crecimiento rápidamente. Evidencia de esta mejor adaptabilidad se observa en la

mayor acumulación de materia seca en los tratamientos con agar (Cuadro 1). A pesar de lo anterior, después de 4 semanas de aclimatización las plantas provenientes de un medio solidificado con agar no lograron superar en peso y tamaño a las plantas producidas con Phytigel®.

Se concluye que tanto *D. trifida* como *D. alata* deben ser cultivadas en medio solidificado con 1.3 g/L o 1.7 g/L de Phytigel® pues esto acelera su crecimiento *in vitro* y en invernadero. Si se observan síntomas de hiperhidricidad en las plantas, estas deben ser subcultivadas, por al menos 1 ciclo de cultivo, en un medio con 7 g/L de agar.

LITERATURA CITADA

- AMMIRATO, P. 1984. Yams. *In: Handbook of plant cell culture*. Ed. by Evans, D.; Sharp, P.; Ammirato, P.; Yamada, Y. Vol. 3. Macmillan Publishers Co. New York, U.S. 619 p.
- BRAND, M. 1993. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 35:203-209.
- FORSYTH, C.; VAN STANDEN, J. 1982. An improved method of *in vitro* propagation of *Dioscorea bulbifera*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1: 275-281.
- HEMPEL, K. 1985. The influence of micropropagation on progeny plants. *Acta Horticulturae* 167:263-272.
- LEON, J. 1978. Botánica de los cultivos tropicales. IICA. San José, Costa Rica. 455 p.
- MARGA, F.; VEBRET, L.; MORVAN, H. 1997. Agar fractions could protect apple shoots cultured in liquid media against hyperhydricity. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 49:1-5.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- NAIRN, B.; FURNEAUX, R.; STEVENSON, T. 1995. Identification of an agar constituent responsible for hydric control in micropropagation of radiata pine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 43:1-11.
- PREECE, J.; SUTTER, E. 1990. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *In: Micropropagation technology and application*. Ed. by Debergh, P. y Zimmerman, R. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. 484 p.
- SINGHA, S.; TOWNSEND, E., OBERLY, G. 1990. Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga*) shoots *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 23:135-142.
- WILLIAMS, R.; TAJI, A. 1991. Effect of temperature, gel concentration and cytokinins on vitrification of *Ole-ria microdisca* (J.M. Black) *in vitro* shoot cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 26:1-6.
- ZIV, M. 1990. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. *In: Micropropagation technology and application*. Ed. by Debergh, P. y Zimmerman, R. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. 484 p.