

Recebido em 23 de Fevereiro de 1996

Multiplicação *in vitro* de videira (*Vitis vinifera* L.): controlo da vitrificação

por

CLÉLIA C. NEVES

Eng^ª Agrónoma, Bolseira PRAXIS XXI

e

SARA AMÂNCIO

Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia

Departamento de Botânica e Engenharia Biológica

RESUMO

O fenómeno da vitrificação é caracterizado por um conjunto de alterações morfológicas, anatómicas e fisiológicas que ocorrem frequentemente nos tecidos em cultura *in vitro* e que comprometem a multiplicação do material vegetal e o seu enraizamento e aclimatização. Os tecidos vitrificados têm um aspecto túrgido e hiperhídrico, são facilmente quebradiços e apresentam cor verde pouco intensa. Trabalhos anteriores indicaram que a vitrificação depende de um conjunto vasto de factores como o nível de reguladores de crescimento, factores nutricionais, trocas gasosas entre o recipiente de cultura e o meio externo, entre outros.

Com o objectivo de estudar a influência exercida na vitrificação pelo tipo de recipiente de cultura *in vitro* e quantidade de reguladores do crescimento presentes no meio, multiplicaram-se plantinhas de videira (*Vitis vinifera* L. cv. 'Touriga Nacional') em dois tipos de recipientes de cultura e em meio de cultura com dois níveis hormonais distintos. Verificou-se que a utilização

de recipientes que facilitam as trocas gasosas reduz a vitrificação, o mesmo acontecendo quando se reduz a metade o nível hormonal do meio de cultura de Murashige e Skoog. No entanto, esta redução, a prazo inviabiliza a multiplicação do material, não sendo por isso aplicável.

SYNOPSIS

Vitrification is the term generally used to characterise the morphological, anatomical and physiological disorders frequently affecting plants during their *in vitro* vegetative propagation as well as their rooting and acclimatization. The so-called vitrified plants appear turgid, hyperhydric, easily breakable and pale green. Previous work reported that vitrification depends on a vast amount of factors such as, levels of growth regulators in the culture media, nutritional factors and gas exchange between the culture vessel and the external atmosphere.

In order to study the influence of the vessel type and level of growth regulators in the culture media, plantlets of grape (*Vitis vinifera* L. cv. 'Touriga Nacional') were cultured *in vitro* in two types of vessels and in media with two distinct levels of growth regulators. Reduced vitrification was observed when the cuttings were placed in vessels that allow greater gas exchange and in MS medium with half strength of growth regulators. However, this reduction is not feasible in long term experiments due to a strong declining of the multiplication rate.

1. INTRODUÇÃO

O termo vitrificação ou hiperhidratação é geralmente utilizado para caracterizar as diversas alterações morfológicas, anatômicas e fisiológicas que ocorrem frequentemente nos tecidos em cultura *in vitro* durante a fase de multiplicação, e que afectam o processo de micropropagação quer nas fases de multiplicação quer no enraizamento e aclimatização (Gaspar, 1991; Ziv, 1991). As plantas ditas "vitrificadas" têm um aspecto túrgido ou hiperhídrico e apresentam superfícies com aparência "molhada" e tecidos hipolenhificados. Os seus órgãos apresentam-se translúcidos, de cor verde pouco intensa e facilmente quebradiços (Kevers *et al.*, 1984; Pâques, 1991). A nível anatómico verifica-se que a maior parte do mesófilo é constituído por parênquima lacunoso muito rico em espaços intercelulares nos quais os gases são substituídos por água (Kevers *et al.*, 1984; Vieitez *et al.*, 1985), as paredes celulares e a cutícula são pouco espessas (Gaspar, 1991) e as células guarda

dos estomas não funcionam correctamente, além da densidade estomática ser menor relativamente à de plantas normais (Majada *et al.*, 1995).

Estas anomalias manifestam-se principalmente a nível foliar e afectam os processos que se desenrolam nesses órgãos, nomeadamente as trocas gasosas (CO₂, vapor de água) e a fotossíntese. Anomalias a nível morfológico surgem também nos caules, mas em menor extensão. Os caules de "plantinhas" vitrificadas são largos e mais espessos e o comprimento dos entre-nós é menor, comparativamente ao de plantas normais (Pâques, 1991). Estas desordens dificultam ou impedem o estabelecimento *ex vitro* das plantas micropropagadas (Ziv, 1991). Quando as alterações existentes não são demasiado profundas, o processo de vitrificação pode ser revertido: as novas folhas ou caules que se formam em plantas vitrificadas, mas que foram transferidas para um meio diferente ou para condições de estufa, apresentam frequentemente uma anatomia idêntica à de plantas normais (Böttcher *et al.*, 1988; Vieitez *et al.*, 1985).

Em fases iniciais, a vitrificação é caracterizada por uma hiperactividade dos tecidos, sendo o número de rebentos e produção de biomassa elevados; no entanto, em fases mais avançadas, a capacidade de proliferação diminui e as plantas tornam-se rapidamente necróticas mesmo após transferência para novo meio de cultura (Pâques, 1991).

Existe um conjunto de factores externos que parecem induzir o aparecimento do fenómeno de vitrificação. No entanto, vale a pena referir que a origem e estado fisiológico da planta-mãe não interferem na vitrificação (Debergh *et al.*, 1981). A maior parte dos casos de vitrificação ocorre com plantas cultivadas num meio mineral completo, como o de Murashige & Skoog (1962) ou em meios com elevada força iónica. Existem algumas evidências que sugerem que uma redução ou anulação da concentração de agente gelificante no meio agrava este fenómeno, apesar de aumentar a taxa de propagação do material vegetal (Böttcher, 1988; Gaspar *et al.*, 1991).

A regeneração de rebentos *in vitro* necessita de uma constante presença de reguladores de crescimento no meio de cultura. Os reguladores de crescimento mais frequentemente utilizados são as citocininas e as auxinas fornecidas em diferentes quantidades conforme a espécie e o tipo de *explant* (Ziv, 1991). O papel dos re-

guladores na vitrificação ainda não foi suficientemente estudado, sendo alguns resultados contraditórios. O papel das auxinas na vitrificação está pouco documentado e é mais frequente relacionar-se este fenómeno com as citocininas e o etileno. Tem sido sugerido que a vitrificação será uma resposta a um excesso de citocininas e que os efeitos benéficos de um aumento na concentração de agentes gelificantes será devido a um decréscimo da disponibilidade desse regulador (Gaspar, 1991).

Também a humidade relativa do ar no interior do recipiente de cultura, que resulta de gradientes de temperatura e do estado hídrico do meio, parece interferir na vitrificação. A realização de trabalhos onde se manipulou o gradiente de pressão de vapor entre a folha e a atmosfera do recipiente de cultura conduziu à hipótese da humidade relativa (HR) elevada ser o agente causal da vitrificação (Böttcher *et al.*, 1988; Wardle *et al.*, 1983). No entanto, segundo Gaspar (1991), a HR poderá ser um amplificador mas não um indutor do processo.

Presentemente aceita-se que a vitrificação é o resultado de um fenómeno de *stress*, onde vários factores (citocininas, NH_4^+ , humidade, etc.) actuam sinergicamente e em determinada sequência. Neste sistema o etileno parece desempenhar um papel chave, apesar da sua sequência de acção ainda não ter sido provada. De facto, a atmosfera em recipientes de cultura onde se desenvolvem plantas vitrificadas, começa por acumular etileno a uma taxa elevada, supostamente devido ao *stress* gerado pelos altos níveis de humidade ou de reguladores do crescimento. Segundo alguns autores (Kevers *et al.*, 1984), um forte aumento de etileno desencadeia um processo de retro-inibição da sua síntese que faria baixar os seus níveis para valores inferiores aos normais; como consequência, verifica-se uma diminuição da actividade de enzimas reguladas por esta hormona gasosa e cujos produtos entram na constituição da parede celular, nomeadamente a lenhina.

A compreensão do papel desempenhado pelos vários factores de cultura na promoção do desenvolvimento anormal é de um interesse considerável pois o conhecimento destas condições pode fornecer os instrumentos necessários para o controlo da morfogénese *in vitro* (Gaspar, 1991). Assim, a manipulação das condições de cultura que diminuam a ocorrência de vitrificação poderá conduzir a ganhos notáveis, uma vez que este fenómeno origina perdas elevadas de material e logo prejuízos a nível das empresas e

laboratórios.

Neste trabalho procurámos identificar as condições de cultura, nomeadamente o tipo de recipiente e de tampa utilizado e a concentração hormonal do meio nutritivo, que permitam minimizar a ocorrência de vitrificação dos tecidos de *Vitis vinifera* L. durante a fase de multiplicação, sem comprometer a sua taxa de multiplicação e aumentando assim o rendimento final.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTURA

"Plantinhas" de videira (*Vitis vinifera* L.) da variedade 'Touriga Nacional' foram instaladas e multiplicadas *in vitro* a partir de segmentos nodais provenientes de plantas de estufa obtidas por micropropagação. Os segmentos nodais foram desinfectados com uma solução de lixívia comercial (com 5% de cloro activo) diluída a 20%, durante 8 minutos e com agitação moderada. O material foi então lavado através de 3 passagens sucessivas por água destilada e desionizada e os *explants* foram isolados em condições assépticas. Estes eram constituídos por segmentos do caule contendo um gomo e parte do pecíolo da folha respectiva e foram colocados verticalmente em tubos de ensaio (T) contendo 20 ml de meio de cultura e tapados com papel de alumínio (Tabela 1). Os tubos permaneceram uma semana no escuro (para reduzir as oxidações), a uma temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ tendo sido depois transferidos para uma câmara de crescimento onde se realizou a fase subsequente de multiplicação do material. Este material foi multiplicado durante três gerações em tubos de ensaio tendo sido em seguida transferido para frascos com tampa de polietileno (Tabela 1).

Os meios de cultura utilizados continham os nutrientes inorgânicos de Murashige & Skoog (1962) (meio MS) e aditivos de natureza vitamínica, hormonal e outros. Os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura foram utilizados em duas concentrações diferentes consoante o tratamento aplicado, estando os valores apresentados na Tabela 2. O pH dos meios preparados foi ajustado a 5,8, após o que se adicionou gelrite na concentração

de 2 g.l⁻¹ e se procedeu à autoclavagem dos meios a 121°C durante 20 minutos.

TABELA 1

Características dos recipientes utilizados na cultura in vitro

Tipo de recipiente	TUBO (T)	FRASCO (F)
Material	vidro	vidro
Diâmetro × altura (cm)	3,0 × 11,0	7,0 × 8,5
Volume de meio (ml)	20	60
nº de explants/recip.	1	3
Tipo de tampa	alumínio	polietileno

TABELA 2

Reguladores de crescimento utilizados nos diferentes tratamentos e durante a fase de multiplicação

Reguladores de crescimento (μM)	Normal (N)	Metade (1/2 N)
NAA	0,50	0,25
BA	5,00	2,50

Durante a fase de multiplicação as plantas receberam um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, tendo sido iluminadas através de lâmpadas fluorescentes Osram L 58 W/21 Hellweiss Lumilux Cool White (Alemanha). A temperatura diurna foi de 25°C±1°C e a nocturna de 22°C±1°C. Os ciclos de multiplicação duraram em média 5 semanas.

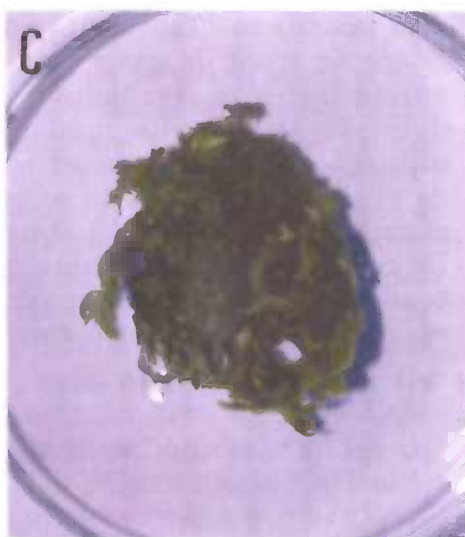
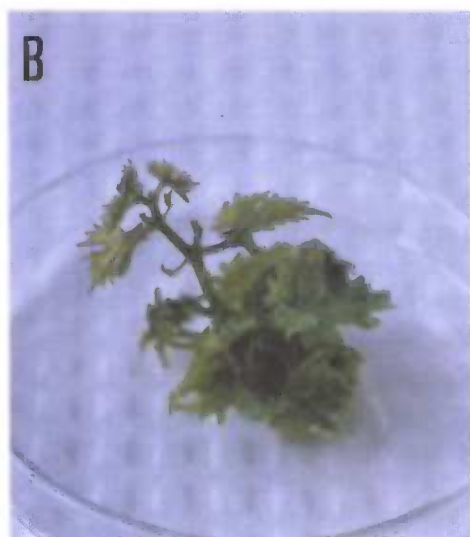
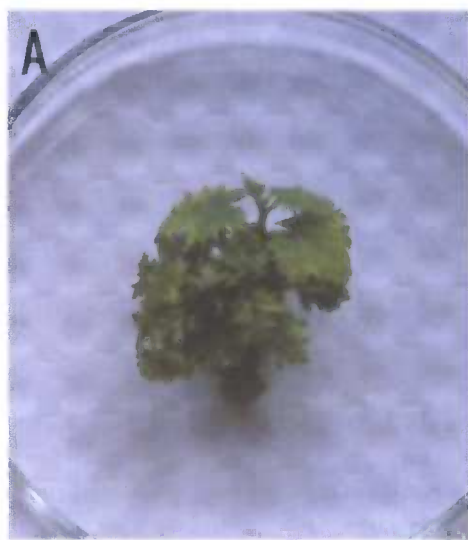
2.2. AVALIAÇÃO DOS TRATAMENTOS

Na altura das repicagens, para cada tufo resultante da ramificação do *explant* inicial, registaram-se os seguintes parâmetros:

- níveis de vitrificação segundo a escala qualitativa apresentada na Figura 1;
- número de ramos axilares produzidos pelo *explant* inicial;
- número de ramos axilares aproveitáveis por cada *explant* inicial, onde não se incluíam os ramos com sinais aparentes de vitrificação.

FIGURA 1

Escala de vitrificação; A - Classe 0: "Plantinhas" sem sintomas externos de vitrificação; B - Classe 1: "Plantinhas" com alguns sintomas de vitrificação, nomeadamente folhas translúcidas e hiperhídricas; C - Classe 2: "Plantinhas" completamente vitrificadas



2.3. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

O tratamento estatístico dos dados foi feito em Windows-Excel 5.0, tendo cada tufo resultante da ramificação do *explant* inicial sido analisado separadamente.

A análise dos dados referentes à escala de vitrificação seguiu conceitos de estatística descritiva, tendo os restantes dados sido sujeitos a testes de ajustamento à distribuição normal e construídos intervalos de confiança a 95% de probabilidade para a média.

3. RESULTADOS

3.1. INFLUÊNCIA DOS RECIPIENTES DE CULTURA

Com o objectivo de estudar a influência dos recipientes de cultura no fenómeno de vitrificação dos tecidos em cultura *in vitro*, realizou-se um ensaio onde as “plantinhas” foram multiplicadas em dois tipos de recipientes e com diferentes níveis hormonais. Os recipientes de cultura utilizados neste trabalho foram os tubos de ensaio tapados com folha de alumínio e os frascos tapados com polietileno (Tabela 1), permitindo estes últimos maior facilidade de troca de gases com o ambiente externo. Na figura 2 apresentam-se os resultados referentes à escala de vitrificação nos diferentes tratamentos ensaiados, donde se pode constatar que a utilização de frascos conduz a um nítido predomínio da classe 0 de vitrificação, o que não se verifica no caso dos tubos, onde as classes mais altas (1 e 2) apresentam uma expressão mais forte. De referir ainda que durante os ensaios realizados se observou a condensação de vapor de água nas paredes interiores dos tubos de ensaio, fenómeno que não ocorreu nos frascos.

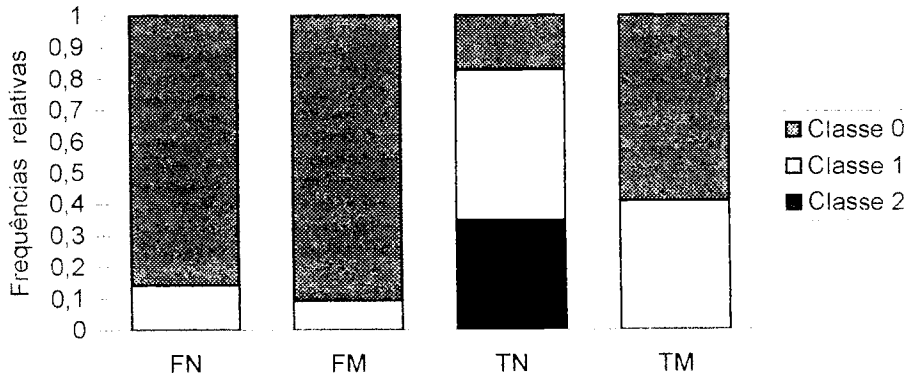
3.2. INFLUÊNCIA DO NÍVEL HORMONAL DO MEIO DE CULTURA

Com vista a estudar a influência do nível hormonal do meio de cultura na vitrificação e proliferação do material, durante a fase

de multiplicação *in vitro*, realizaram-se ensaios com dois níveis hormonais distintos tendo-se seguido a evolução durante 10 ciclos de multiplicação. Os recipientes de cultura utilizados neste caso foram os frascos.

FIGURA 2

Frequências relativas das diferentes classes de vitrificação, na 6ª geração e nas seguintes situações: FN - frascos contendo meio com nível hormonal normal; FM - frascos contendo meio com nível hormonal de metade; TN - tubos contendo meio com nível hormonal normal; TM - tubos contendo meio com nível hormonal de metade



A recolha dos dados referentes à escala de vitrificação permitiu o cálculo das frequências relativas as quais estão representadas nas figuras 3 e 4. Verifica-se que as plantas cultivadas em meio 1/2 N, no geral exibem menor grau de vitrificação do que as cultivadas em meio N. Para ambos os níveis hormonais à medida que o número de repicagens aumentou, o grau de vitrificação diminuiu.

Uma vez que a vitrificação é responsável por perdas de material que podem ser elevadas em certas espécies, será conveniente avaliar até que ponto a aplicação de determinado nível hormonal ou a utilização de determinado recipiente, que reduzem os níveis de ocorrência deste fenómeno, não comprometem o principal objectivo desta fase de micropropagação: a multiplicação de rebentos a uma taxa elevada. Para avaliar o rendimento da multiplicação recolheram-se os valores do número de ramos produzidos

FIGURA 3

Frequências relativas das diversas classes de vitrificação durante 10 ciclos de multiplicação e para o nível hormonal normal (N)

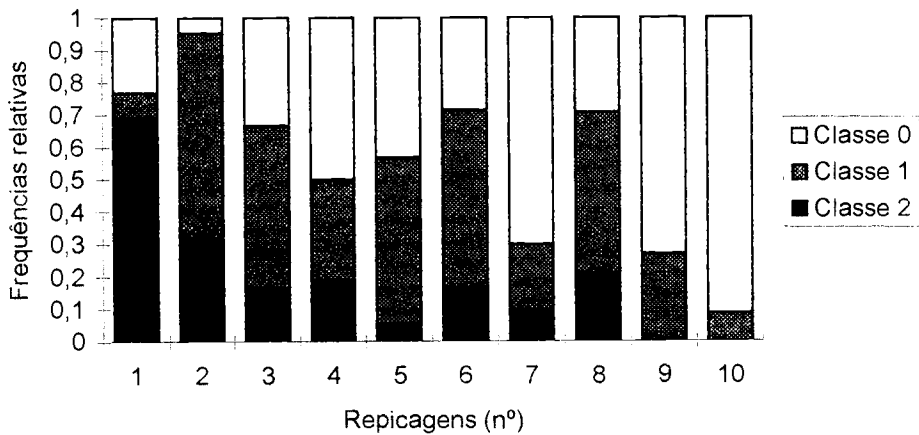
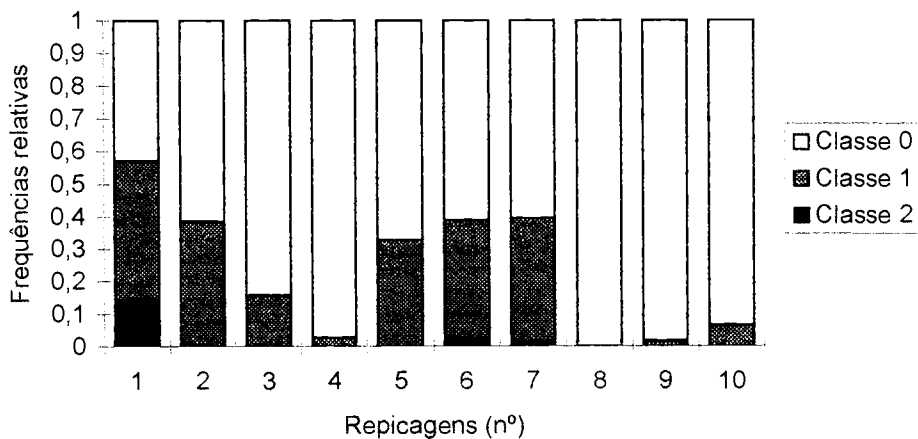


FIGURA 4

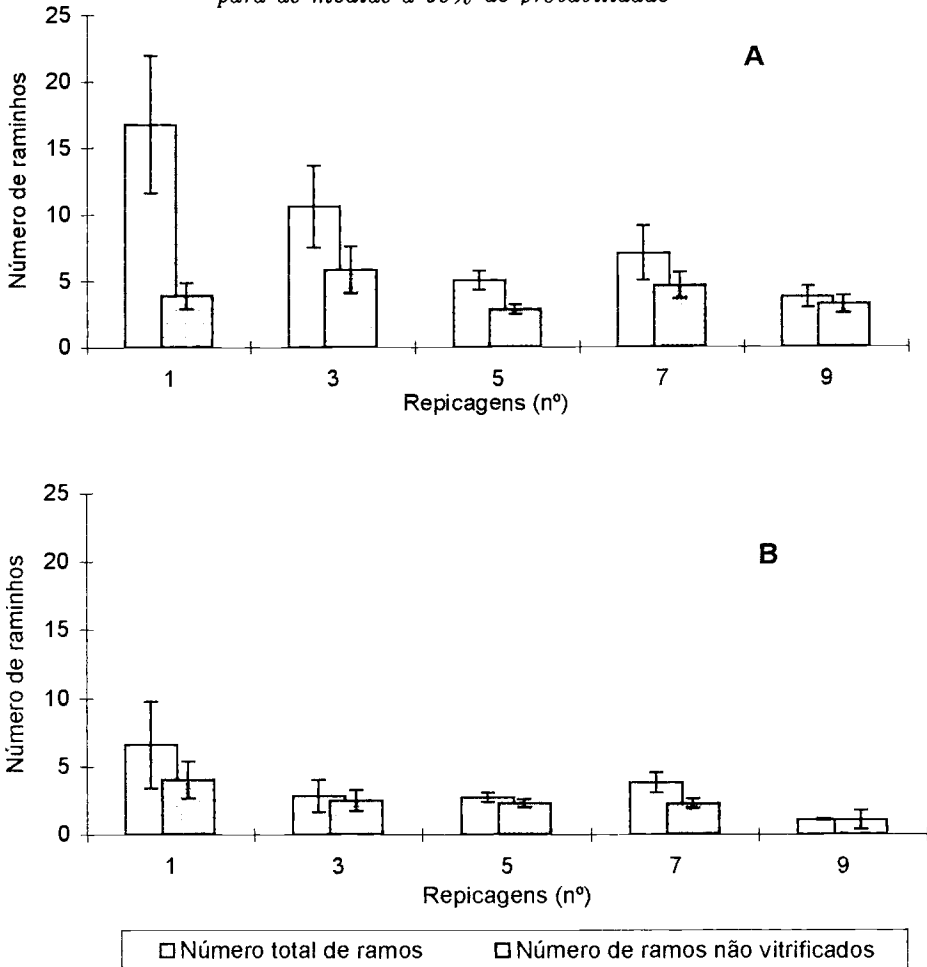
Frequências relativas das diversas classes de vitrificação durante 10 ciclos de multiplicação e para o nível hormonal correspondente a metade (1/2 N)



em média por cada *explant* inicial e dentro destes o número de ramos não vitrificados, estando os resultados representados na figura 5.

FIGURA 5

Comparação entre as médias do número de total de ramos e o número de ramos não vitrificados, produzidos por explant, durante 10 ciclos de multiplicação (representam-se somente as repicagens ímpares), para nível hormonal normal (A) e metade (B). Apresentam-se intervalos de confiança para as médias a 95% de probabilidade



Os *explants* multiplicados em meio com nível hormonal normal (N) apresentaram uma taxa de multiplicação bastante elevada e sempre superior à registada em *explants* colocados em meio 1/2 N, nas repicagens respectivas. Em ambos os casos a taxa de multiplicação sofreu um decréscimo à medida que o número de

repicagens aumentou. No entanto, os *explants* multiplicados em meio 1/2 N, além de terem menor taxa de multiplicação e reduzida quantidade de rebentos utilizáveis, a partir da 9ª repicagem apresentam um aspecto clorótico e crescimento e ramificação reduzidos ou mesmo nulos.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Estudos realizados por Kozai e seus colaboradores (1986) revelaram que as trocas de CO₂ em vários tipos de recipientes tapados com diferentes materiais era bastante semelhante para os diferentes tipos de recipientes desde que estes estivessem tapados com o mesmo tipo de cobertura, ou seja a influência do volume de ar no interior do recipiente era baixa. A taxa de troca deste gás, em recipientes tapados com plástico era quase dez vezes superior à de recipientes tapados com folha de alumínio. De Proft e colaboradores (1985) demonstraram também que a excessiva acumulação de etileno nos recipientes pode ser evitada através da utilização de tampas que facilitem as trocas gasosas com o exterior. Kervers e colaboradores (1992) confirmaram a acumulação de etileno em elevadas concentrações no interior de recipientes de cultura e que essas concentrações são variáveis com o tipo de recipiente e modo de fecho deste. Também Fal e colaboradores (1995) concluíram que é possível reduzir o grau de vitrificação de tecidos de *Dianthus caryophyllus* através de uma redução da quantidade de etileno presente na atmosfera de cultura, aumento da ventilação ou aumento do volume de ar no recipiente. Estes e outros dados levam-nos a pensar que as diferenças no grau de vitrificação observadas nos dois tipos de recipientes - tubos e frascos - não é devida propriamente à forma ou volume do recipiente, mas ao tipo de cobertura que foi utilizado. Os tubos de ensaio ao serem tapados com papel de alumínio, um material estanque aos gases, não permitiram a saída ou entrada destes, contribuindo para um aumento da vitrificação dos tecidos em cultura. Pelo contrário, os frascos fechados com filme de polietileno, permitem a realização de trocas gasosas entre o recipiente e o meio externo. Assim, a utilização durante a fase de multiplicação, de frascos com tampas que facilitem as trocas gasosas permite de algum modo re-

duzir alguns factores causadores ou ampliadores do fenómeno de vitrificação, permitindo de certo modo controlar este fenómeno (Böttcher *et al.*, 1988; Gaspar, 1991). Este aspecto poderá ser esclarecido através da quantificação do etileno acumulado nos recipientes em diferentes condições de cultura e com diferentes tipos de tampas (Gaspar & Kevers, 1985; Kevers *et al.*, 1984).

O efeito das citocininas presentes no meio nutritivo sobre o fenómeno de vitrificação foi estudado por numerosos autores. Aparentemente a vitrificação poderá ser uma resposta dos tecidos a um excesso de citocininas; no entanto, verificou-se que alguns rebentos vitrificam na ausência destes compostos. Este facto levou à hipótese destes compostos não serem indutores do processo mas actuarem sinergicamente com outros factores. O papel das auxinas no fenómeno da vitrificação não tem sido muito estudado; no entanto, alguns autores sugerem que a vitrificação poderá depender do balanço hormonal entre citocininas e auxinas.

A redução do nível hormonal do meio de cultura MS aparentemente permite controlar a vitrificação, reduzindo muito a incidência desta anomalia durante a fase de multiplicação. Esta redução tem, no entanto, grandes inconvenientes a nível do rendimento da fase de multiplicação que se vê bastante penalizado nas plantas multiplicadas em meio 1/2 N, não se revelando aplicável na prática e a longo prazo. Em meio com 1/2 N verifica-se pois uma menor produção total de ramos, sendo no entanto a produtividade bastante elevada. É de salientar que em ambos os casos a taxa de multiplicação sofreu um decréscimo à medida que o número de repicagens aumentou, no entanto, o número de ramos não vitrificados manteve-se sensivelmente constante ao longo do tempo. O decréscimo do nível de vitrificação à medida que o número de repicagens aumentou pode estar relacionado com o facto de em cada repicagem se ter realizado uma selecção do material no sentido de utilizar somente plantas não vitrificadas, resultando a prazo no menor grau de vitrificação das plantas em estudo. Estes e outros resultados parecem indicar que o controlo da vitrificação dos tecidos deve basear-se na manipulação das condições da atmosfera de cultura, por exemplo, através da utilização de recipientes com filtros de ventilação (Majada *et al.*, 1995) ou de tampas permeáveis aos gases.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela bolsa PRAXIS XXI/BM/1681/94, e está integrado no Projecto JNICT/PBIC/AGR/1461/92.

BIBLIOGRAFIA

- BÖTTCHER, I.; ZOGLAUER, K.; GÖRING, H. (1988) — Induction and reversion of vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 72: 560-564.
- DE PROUF, M.P.; MAENE, L.J.; DEBERGH, P.C. (1985) — Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 65: 375-379.
- DEBERGH, P.C.; HARBAOUI, Y.; LEMEUR, R. (1981) — Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potencial. *Physiologia Plantarum*, 53: 181-187.
- FAL, M.A.; MAJADA, J.P.; SUAREZ, M.J.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. (1995) — Relation between ethylene accumulation and hyperhydridity in the micropropagation of carnation. *Ecophysiology and Photosynthetic in vitro cultures*, 199-200.
- GASPAR, TH. (1991) — Vitrification in micropropagation. In Y.P.S. Bajaj (ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-Tech Micropropagation I*. pp. 116-126.
- GASPAR, TH.; PENEL, C.; HAGEGE, D.; GREPPIN, H. (1991) — Peroxidases in plant growth, differentiation, and development processes. In J.Lobarzewsky, H. Greppin, C. Penel & Th. Gaspar (eds.), *Biochemical, Molecular, and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. University M. Curie-Sklodowska (Lublin, Poland) e University of Geneva (Switzerland). pp. 249-280.
- KEVERS, C.; BOYER, N.; COURDUROUX, J.-C.; GASPAR, TH. (1992) — The influence of ethylene on proliferation and growth of rose shoot cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28: 175-181.
- KEVERS, C.; COUMANS, M.; COUMANS-GILLÈS, M.F.; GASPAR, TH. (1984) — Physiological and biochemical events leading to vi-

- trification of plants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 61: 69-74.
- KOZAI, T.; FUJIWARA, K.; WATANABE, I. (1986) — Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels. 2. Effects of stoppers and vessels on gas exchange rates between inside and outside vessels closed with stoppers. *J. Agr. Met.*, 42: 119-127.
- MAJADA, J.P.; FAL, M.A.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. (1995) — Influence of the *in vitro* environment on the stomatal physiology and morphology of micropropagated *Dianthus caryophyllus* cv. Nelken. *Ecophysiology and Photosynthetic in vitro cultures*, 141-144.
- MAJADA, J.P.; TADEO, F.; FAL, M.A.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. (1995) — Efecto del ambiente en el fenotipo de *Dianthus caryophyllus* producido *in vitro*: morfología, anatomia y ultraestructura. *IV Congresso Luso-Espanhol de Fisiologia Vegetal*, Estoril, Portugal, p. 254.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962) — A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- PÂQUES, M. (1991) — Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects. *Acta Horticulturae*, 289: 283-290.
- VIEITEZ, A.M.; BALLESTER, A.; SAN-JOSE, M.C.; VIEITEZ, E. (1985) — Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 65: 177-184.
- WARDLE, K.; DOBBS, E.B.; SHORT, K.C. (1983) — *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plant to humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 108 (3): 386-389.
- ZIV, M. (1991) — Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In P.C. Debergh & R.H. Zimmerman (eds.), *Micropropagation-Technology and Application*. Kluwer Academic Press. Dordrecht. Holanda. pp. 45-69.