

DENSIDAD ESTOMATAL Y POTENCIAL HÍDRICO EN PLANTAS DE TOMATE (*Physalis ixocarpa* Brot.), PROPAGADAS POR CULTIVO DE MERISTEMOS

C. Bazaldúa-Muñoz^{1*}; E. Ventura-Zapata¹;
G. Salcedo-Morales¹; U. Maldonado Amaya²;
A. López García³

¹Laboratorio de Biotecnología-Cultivo de Células y Tejidos Vegetales,
Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional.
Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 8.5 Col. San Isidro,
Yautepec, Morelos, MÉXICO.

Correo-e: cbazaldua@ipn.mx (^{*}Autor responsable)

²Campo Experimental Zacatepec, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales,
Agrícolas y Pecuarias. Zacatepec, Morelos. MÉXICO.

³Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Ambientales,
Universidad Autónoma de Guerrero. MÉXICO.

RESUMEN

El tomate de cáscara es una Solanácea de origen mexicano, que se desarrolla en forma silvestre o cultivada. La propagación *in vitro* por cultivo de meristemos apicales es una alternativa para producir plantas en forma masiva y libres de patógenos, pero en muchas ocasiones la aclimatación ha sido el factor limitante para lograr este objetivo. Existen pocos reportes sobre micropropagación de esta especie y este es el primero en el que se evalúan los cambios en la densidad estomatal y el potencial hídrico durante la aclimatación de plantas de tomate, obtenidas por cultivo de meristemos. Plantas de 30 días de edad y de tamaño uniforme se colocaron en sistemas hidropónicos individuales, con cubiertas plásticas, durante siete semanas. Las cubiertas se abrieron gradualmente cada siete días y se registró la temperatura y la humedad relativa para calcular el potencial hídrico en la cámara de crecimiento y el sistema de aclimatación, en la sexta semana los valores de este parámetro fueron muy cercanos (-107.8 y -102.2 ± 4.91, respectivamente). Por otro lado, se evaluó la densidad estomatal a los 15, 30 y 45 días de aclimatación, se observaron diferencias significativas entre el haz y el envés de las hojas y entre edades de las plantas. Al relacionar los datos de potencial hídrico y densidad estomatal se observó una correlación elevada. Después del periodo de aclimatación la sobrevivencia de plantas fue del 100 %.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: aclimatación, densidad estomatal, micropropagación, potencial hídrico, *Physalis ixocarpa* Brot.

STOMATAL DENSITY AND WATER POTENTIAL ON HUSK TOMATO (*Physalis ixocarpa* Brot.), MICROPROPAGATED BY MEAN OF MERISTEM CULTURE

ABSTRACT

The husk tomato is a Solanaceous plant of Mexican origin. In Mexico, this plant can grow at wild or culture way. The *in vitro* propagation is an alternative for producing very much healthy plants. But some times the acclimatization has been the limiting factor to reach this objective. There are not so much reports related with husk tomato micropropagation, and this is the first where the changes on stomatal density and water potential, are evaluated. That evaluation was done during the acclimatization from plantlets obtained by mean of apical meristem culture. Plants of 30 days old with similar size were placed in individual hydroponics system, during seven weeks, all of them covered with plastic covers, which were opened each seven days. Each time, the temperature and relative humidity were measured, in the acclimatization system and the growth chamber, for calculating the water potential. At the sixth week, the water potential in the acclimatization system was close to that of the growth chamber (-107.8 and -102.2 ± 4.91 respectively). On the other hand, the stomatal density was evaluated at 15, 30 and 45 days during the acclimatization stage. Significant differences were observed at this parameter between adaxial and abaxial leaf plant and between plant ages. When both water potential and stomatal density data were related, a great correlation was observed. 100 % of the plants survived later the acclimatization stage.

ADDITIONAL KEY WORDS: acclimatization, stomatal density, water potential, micropropagation, *Physalis ixocarpa* Brot.

INTRODUCCIÓN

El tomate de cáscara es una Solanácea de origen mexicano, que se desarrolla en forma silvestre o cultivada. El amarillamiento del tomate de cáscara, es considerado una enfermedad de origen viral que presenta síntomas como el moteado y mosaico foliar de color amarillo intenso, deformación de hojas, clorosis, enanismo, marchitez y muerte de la planta (De la Torre-Almaráz *et al.*, 2003). Esta enfermedad causa pérdidas hasta del 100 % en este cultivo. Entre las alternativas para solucionar dicho problema, están: a) termoterapia, que consiste en causar un “choque térmico” en las semillas, con lo que se eliminan los virus que se transmiten por semilla, b) selección de genotipos tolerantes y c) erradicar los virus por cultivo de meristemos. Dentro de éstas, la que mayores expectativas presenta es el uso de material genético tolerante, pues a la fecha no se ha logrado el control de esta enfermedad con otros métodos fitosanitarios. Este trabajo es complementario a otra investigación que se desarrolló de manera conjunta entre el CEPROBI – IPN, el INIFAP Campo Experimental Zacatepec y la Universidad Autónoma de Chapingo; en el cual se combinaron las dos últimas metodologías para incrementar la posibilidad de obtener plantas libres de virus.

La aclimatación de plántulas en condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro* es el periodo más crítico en la micropropagación, ya que durante el cultivo *in vitro* tienen condiciones de alta humedad relativa (entre 85 y 100 %), generalmente baja irradiación, carencia de CO₂, presencia de fuentes de carbono y reguladores del crecimiento en el medio; mismas que inducen a la planta a desarrollar una estructura y fisiología anormales, ya que entre otros aspectos, sus raíces son muy vulnerables al daño físico, la tasa de fotosíntesis es muy baja y su aparato estomatal es poco funcional, acompañado este último de cambios en el tamaño, la forma y la densidad estomatal (Pospíšilová *et al.*, 1997; Tichá *et al.*, 1999). Con estas características, las plantas propagadas *in vitro* tienen poco éxito de adaptación en el ambiente exterior, en donde la humedad relativa es menor y muy variable (entre 30 y 80 %, dependiendo de la hora del día y de la temporada del año) (Kozai, 1991; Dami y Hughes, 1995; Pospíšilová *et al.*, 1998), el sustrato es áspero y sin fuente de carbono. Durante este cambio de condiciones tan drástico las plantas mueren, principalmente debido a la elevada tasa de transpiración (Santamaría *et al.*, 1993; Pospíšilová *et al.*, 1999), y adicionalmente por la ausencia de una fuente de carbono, así como por el daño mecánico a las raíces, ocasionado por el sustrato. La literatura reporta diversos estudios que demuestran la gran importancia que tiene la estructura, morfología y funcionalidad del aparato estomatal durante la aclimatación de las plantas producidas *in vitro*. Entre los cambios observados se reportan variaciones en la densidad estomatal (reducción-incremento) y en la forma de los estomas. Al respecto, Noé y Bonini (1996) encontraron una densidad estomatal más alta, en condiciones *ex vitro* con respecto a las condiciones *in vitro*, en plantas de *Vaccinium*

corymbosum; mientras que Jamison y Renfroe (1998) observaron esa misma respuesta en *Betula uber*, pero la densidad más baja, fue reportada por Brainerd *et al.* (1981) en *Prunus insititia*. Con relación a la morfología de los estomas Dami y Hughes (1997) y Ali-Ahmad *et al.* (1998) en sus estudios realizados con plantas de vid, observaron aperturas estomatales más grandes en las plántulas desarrolladas en condiciones *in vitro* que en las plantas aclimatadas o en aquellas tratadas con polietilenglicol durante la aclimatación de esta especie. En otro estudio realizado con plántulas de papa desarrolladas *in vitro* bajo condiciones foto - autotróficas (sin sacarosa, medio enriquecido con CO₂ y alto flujo fotosintético de fotones en el medio) y en condiciones foto – mixotróficas (20 g-litro⁻¹ de sacarosa en el medio), se observó que en el primer caso los estomas se comportaron normalmente (apertura en luz y cierre en la oscuridad), la densidad estomatal de las plántulas crecidas bajo estas condiciones fue dos veces mayor, comparada con la de las plántulas crecidas en condiciones foto mixotróficas (Sobayed *et al.*, 1999).

El objetivo de esta investigación fue determinar la relación que existe entre la densidad estomatal y el cambio gradual del potencial hídrico, durante la aclimatación de plántulas de tomate obtenidas mediante cultivo de meristemos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar este experimento se utilizaron semillas de plantas de tomate proporcionadas por personal del Campo Experimental Zacatepec del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CE-Zacatepec - INIFAP), donde en colaboración con el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI – IPN) se desarrolla el proyecto “Obtención de genotipos resistentes al amarillamiento en el estado de Morelos”.

Material biológico. Se realizó una colecta en las zonas productoras de tomate de cáscara en el estado de Morelos, se seleccionaron las plantas de tomate que no mostraban los síntomas del amarillamiento. Posteriormente se realizaron otras dos selecciones masales en el CE Zacatepec - INIFAP. Las plantas que no mostraron los síntomas de amarillamiento fueron seleccionadas como donadoras de semillas. Las semillas fueron desinfectadas [etanol (70 %) durante 1 min, hipoclorito de sodio (1 %) durante 10 min y enjuagadas] y germinadas en condiciones asépticas, en el laboratorio de cultivo de células y tejidos vegetales del CEPROBI - IPN, para la obtención de plántulas *in vitro*; de éstas, se tomaron los cotiledones para regenerar plántulas, de las que posteriormente se utilizaron los meristemos apicales para la obtención y multiplicación de las plántulas utilizadas en el presente trabajo. La siembra de meristemos se llevó a cabo en un medio de cultivo Murashige and Skoog (1962), suplementado con 0.2 mg-litro⁻¹ de 6-bencilaminopurina, 0.1 mg-litro⁻¹ de ácido

naftalenacético, 0.9 mg·litro⁻¹ de tiamina-1, 0.5 mg·litro⁻¹ de ácido fólico, 0.05 mg·litro⁻¹ de biotina, 30 g·litro⁻¹ de sacarosa y 8 g·litro⁻¹ de agar; el pH se ajustó a 5.8 y se dejaron en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25 ± 2 °C, 16 horas de fotoperíodo y una intensidad luminosa de 310 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Sistema de aclimatación y determinación de potencial hídrico (y). El Sistema de aclimatación se estableció de acuerdo con la metodología reportada por Ventura *et al.* (2003), que consiste en un sistema hidropónico con solución nutritiva (Hoagland y Arnon, 1950) y una cubierta plástica en la parte aérea de las plantas. Este sistema se colocó en la cámara de crecimiento bajo las condiciones de temperatura, fotoperíodo e irradiación anteriormente citadas. La cubierta plástica se abrió gradualmente mediante perforaciones; de tal forma que las plantas quedaron totalmente expuestas a la humedad de la cámara de cultivo al cumplirse 40 días. A continuación, se cambió la solución mineral contenida en los frascos por solución fresca y las plantas se mantuvieron en estas condiciones un mes más. Después de cada perforación en la cubierta de plástico, se tomaron lecturas de HR dentro del sistema de aclimatización y en la cámara de incubación. Con estos valores se calculó el potencial hídrico (y) atmosférico en ambos espacios, mediante la siguiente ecuación: $y = -1.06 T \log (100 / \text{HR})$ (Salisbury and Ross, 1994), donde y está dado en MPa y T en °K.

Determinación de la densidad estomatal. Estudios previos realizados con plántulas de *Curcuma longa* demostraron que existe una diferencia notable entre el número de estomas en las plantas *in vitro* y el de plantas aclimatadas (0 y 45 días después de iniciado el proceso de aclimatación) (datos no publicados). Considerando los datos anteriores se decidió realizar el conteo de estomas a los 15, 30 y 45 días después de iniciado el proceso de aclimatación. Asimismo, se planteó la posibilidad de que hubiese diferencias significativas en el número de estomas en la hoja, dependiendo del sitio donde se realizara el conteo; para eliminar esa posibilidad se procedió a delimitar tres áreas en la misma (base, media y apical). El conteo se realizó por triplicado en el haz y en el envés. En cada conteo se tomó una microfotografía, con lo que se tuvieron 54 imágenes en cada etapa.

Preparación de muestras para su observación al microscopio. Esta se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Capellades *et al.* (1990), que consiste en colocar una capa de barniz (de uñas) transparente en el haz y el envés de la hoja, dejar que se seque, retirar y colocar en portaobjetos para observar al microscopio. El conteo de estomas se hizo en una área de 0.12 mm², tanto en el haz como en el envés. Se utilizó un microscopio compuesto (Nikon, Alphaphot-2 YS2, Tokio, Japón) con cámara integrada (MTI, DC330, Tokio, Japón) y el software utilizado en el análisis de imágenes fue el Meta Imaging Series for Microsoft

Windows (versión 4.0, Universal Imaging Corporation, Downingtown, Pennsylvania, USA).

Análisis estadístico. Los datos se sometieron a un análisis de varianza. La diferencia entre las medias en cada caso fue comparada utilizando la prueba de Tukey con $P = 0.05$. La densidad estomatal se reporta en número de estomas por mm². El software utilizado en el análisis estadístico fue el Sigma Stat Versión 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestran los resultados referentes a los cambios progresivos de la densidad estomatal (DE) en el haz y el envés a los 15, 30 y 45 días después de iniciado el proceso de aclimatación. La DE se incrementó de manera gradual, en el haz y en el envés en función del tiempo de aclimatación. Se encontró diferencia significativa entre la DE del haz y el envés a los 15, 30 y 45 días, siendo más notable a los 45 días ($211.11 \pm 8.3\cdot\text{mm}^{-2}$ en el envés y $42.22 \pm 1.07\cdot\text{mm}^{-2}$ en el haz). La mayor variabilidad se observó en el día 30, lo cual está directamente relacionado con el proceso mismo de la aclimatación, ya que a los 15 días de iniciado el proceso, el cambio de la humedad relativa fue muy ligero, porque la apertura de las cubiertas se realizó de manera gradual; mientras que a los 45 días la planta está completamente aclimatada y su aparato estomatal está plenamente desarrollado, por lo que su patrón de DE es uniforme. Lo anterior, corrobora lo reportado en la literatura con respecto al efecto de la humedad y la temperatura, en la fisiología y morfología de la planta. Es importante mencionar que en una planta de 30 días de edad se observó que en las áreas próximas a las bifurcaciones de las nervaduras foliares el número de estomas por unidad de superficie se incrementó, lo cual influyó en la desviación estándar obtenida (44.75 ± 23.28), esto podría indicar alguna relación entre los vasos conductores y la distribución de las células estomatales.

Con relación a la morfología observada en las diferentes etapas, los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Dami y Hughes (1997) y Ali-Ahmad *et al.* (1998) quienes observaron aperturas estomatales más grandes en plántulas de vid desarrolladas en condiciones *in vitro*, en este estudio se puede observar como los estomas en plantas con menor tiempo de aclimatación son de mayor tamaño.

Al aplicar la prueba de Tukey en el análisis estadístico, se determinó que la diferencia entre la DE del haz y el envés si es significativa en cada una de las fechas evaluadas. Lo mismo ocurre para la DE del envés, entre los tres tiempos. Sin embargo, la diferencia en la DE del haz no es significativa, entre cada una de las fechas evaluadas $P = 0.05$.

También se observaron diferencias específicas entre la densidad estomatal de cada sección de la hoja, sin embargo, este comportamiento no fue uniforme, lo cual impide

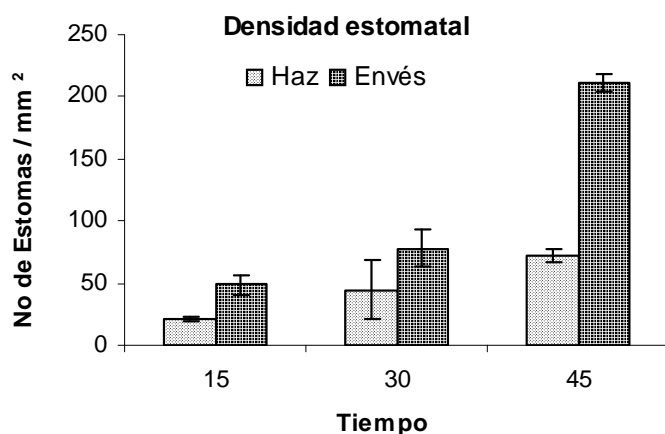


FIGURA 1. Densidad estomatal del haz y envés/ tiempo de aclimatación. Los datos representan el promedio de nueve repeticiones y fueron convertidos a su logaritmo natural (Ln) para realizar el análisis estadístico.

relacionar la densidad estomatal con secciones específicas de la hoja. En la Figura 2 es posible observar estas diferencias específicas por sección en el haz y el envés y por etapa de muestreo.

Al analizar las tres secciones del envés se encontró que en cada una hubo un incremento gradual en función de la etapa de muestreo. En la parte apical del envés, la DE fue mayor con respecto a las otras dos secciones a los 15 y 30 días (56.48 ± 3.21 y 100 ± 17.35 , respectivamente); pero a los 45 días la DE en esta sección (157.41 ± 28.10) fue menor, con respecto a las otras dos. En cuanto a la parte basal del envés, se observó que el incremento en su DE fue gradual y este ocurrió en función de la etapa de muestreo; pues a los 15 días presentó la DE más baja con respecto a las otras dos secciones (40.28 ± 6.05); a los 30 el valor fue ligeramente inferior (66.67 ± 12.11) al de la parte media (67.59 ± 16.28), pero a los 45 días mostró la mayor

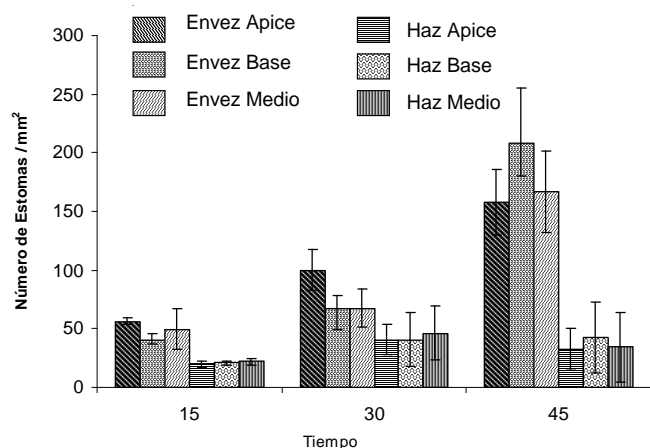


FIGURA 2. Densidad estomatal por sección, por superficie y por tiempo de aclimatación. Las columnas representan el promedio de tres repeticiones.

DE (208.33 ± 47.39). Finalmente la sección media del envés presentó una DE intermedia en cada una de las etapas de muestreo. La única diferencia significativa entre secciones del envés, se observó a los 30 días entre las secciones apical y basal.

En las secciones del haz la DE se incrementó aproximadamente 100 % entre 15 y 30 días (20 ± 2.5 y 43 ± 12.8 , respectivamente), pero no hubo diferencia entre 30 y 45 días. Finalmente a los 45 días parece establecerse un patrón de distribución de la densidad estomatal, donde la DE más alta corresponde a la parte basal del haz y del envés (208.33 ± 47.39 y 42.59 ± 12 , respectivamente) y la más baja a la parte apical, tanto en el envés como en el haz (157.41 ± 28.10 y 32.41 ± 15.5 , respectivamente); sin embargo, la desviación estándar es muy alta y por ello no se puede aseverar que así suceda.

En la Figura 3 se observa la forma y el número de estomas por unidad de superficie (0.12 mm^2), en cada etapa de muestreo.

En el Cuadro 1 se presentan los resultados de potencial hídrico (ψ) del sistema de aclimatación y de la cámara de crecimiento durante seis semanas. Se observó un incremento gradual del ψ en el sistema de aclimatación, en función de la apertura de la cubierta plástica. Al finalizar el experimento, los valores de potencial hídrico (ψ) de la

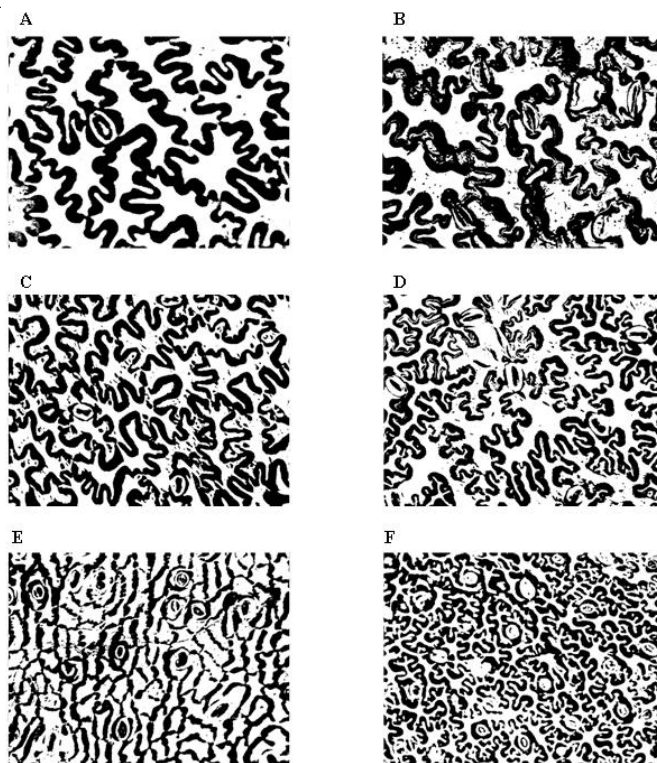


FIGURA 3. Número de estomas por 0.12 mm^2 a los 15 días: A) haz, B) envés; 30 días C) haz, D) envés y 45 días E) haz, F) envés. Las microfotografías fueron tomadas con el objetivo 10 X.

CUADRO 1. Promedio de potencial hídrico (ψ) en los sistemas de aclimatación de plantas de tomate y en la cámara de crecimiento por semana.

Tiempo (semanas)	Humedad relativa en sistema de aclimatación	Promedio de ψ de las plantas/semana*	ψ de la cámara de crecimiento/semana
1	94.2 \pm 1.06	- 8.28 \pm 1.55 **	- 112.70
2	83.1 \pm 1.40	- 25.59 \pm 2.31	- 107.67
3	78.5 \pm 1.05	- 33.46 \pm 1.87	- 110.06
4	71.5 \pm 1.34	- 52.59 \pm 7.33	- 106.49
5	52.5 \pm 1.06	- 87.90 \pm 8.69	- 103.79
6	47.5 \pm 1.74	-102.2 \pm 4.91	- 107.80

*El valor más cercano a cero, indica un mayor potencial hídrico.

**Los valores representan el promedio de tres repeticiones \pm la desviación estándar.

cámara de crecimiento y del sistema de aclimatación fueron muy cercanos (-107.8 y -102.2 \pm 4.91, respectivamente).

Al graficar los datos de DE y de potencial hídrico, se observó una relación directamente proporcional entre ambos parámetros (Figura 4),

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con lo reportado por Pospíšilová *et al.* (1997) y Tichá *et al.* (1999), quienes refieren que el cambio de las condiciones *in vitro* a las de *ex vitro* causan modificaciones estructurales en las plantas, entre ellos la densidad estomatal. Por otro lado, Roberts *et al.* (1990) refieren que los cambios ocurridos durante la aclimatación son influenciados por las condiciones de humedad en el ambiente y están

relacionados con el mecanismo de retención de agua dentro de los tejidos de la planta para evitar la deshidratación y muerte de las mismas.

La humedad relativa y la temperatura son factores que determinan el potencial hídrico y, observándose una correlación directamente proporcional entre la HR y el ψ . El movimiento masivo del agua ocurre de manera espontánea de mayor a menor ψ , el sistema sustrato - planta - aire es un claro ejemplo de ello, ya que el movimiento se realiza desde el suelo (en condiciones normales el ψ suelo = -1.5 Mpa) a la planta (en promedio el ψ planta = -2.6 Mpa) y de esta a la atmósfera (ψ aire atmosférico, = -30.1 Mpa) (Salisbury and Ross, 1994). Particularmente en los contenedores sellados que se utilizan para el cultivo *in vitro* el ψ adquiere un valor cercano a cero (Aguilar *et al.*, 2000), lo que se corrobora con los resultados de este trabajo (Cuadro 1).

Los resultados obtenidos muestran que la apertura gradual de la cubierta plástica del sistema de aclimatación permitió la disminución paulatina del potencial hídrico del mismo hasta alcanzar un equilibrio con el potencial hídrico de la cámara de crecimiento; lo cual influyó en el incremento de la densidad estomatal, muy probablemente en la regeneración del mecanismo de cierre estomatal y en consecuencia en la regulación de la pérdida de agua por transpiración. Lo anterior se vio reflejado en el 100 % de supervivencia de las plantas al término del experimento.

CONCLUSIONES

La disminución gradual del potencial hídrico (ψ) influyó en el incremento de la densidad estomatal en plantas de tomate de cáscara durante su aclimatación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP – IPN) por el financiamiento otorgado para el desarrollo del proyecto de investigación "Producción de

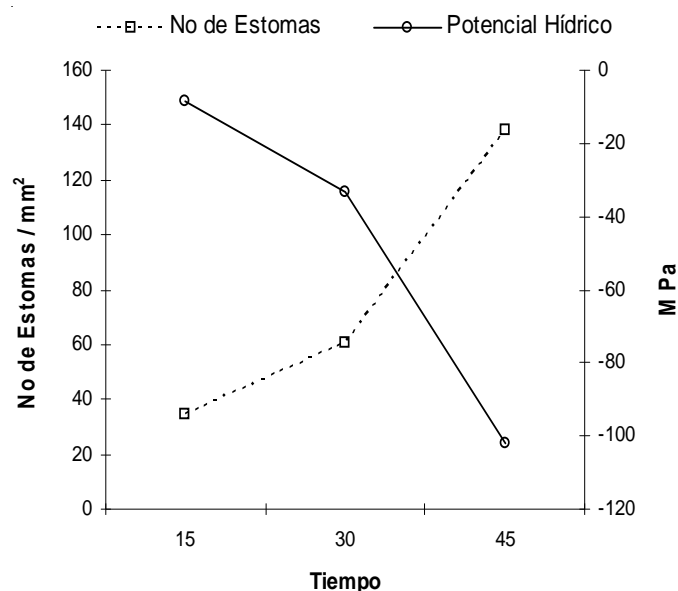


FIGURA 4. Correlación entre la densidad estomatal y el potencial hídrico de los sistemas de aclimatación. Los valores de potencial hídrico representan el promedio de diez repeticiones, mientras que los valores de densidad estomatal representan el promedio de tres repeticiones.

metabolitos secundarios de interés farmacológico (antialacránico) en plántulas *in vitro* de *Aristolochia elegans* (Mast.)” CGPI20060240.

LITERATURA CITADA

- AGUILAR, M. L.; ESPADAS, F. L.; COELLO, J.; MAUST, B. E.; TREJO, C.; ROBERT, M. L.; SANTAMARÍA, J. M. 2000. The role of abscisic acid in controlling leaf water loss, survival and growth of micropropagated *Tagetes erecta* plants when transferred directly to the field. *Journal of Experimental Botany*. 51:1861-66.
- ALI-AHMAD, M.; HUGHES, H. G.; SAFADI, F. 1998. Studies on stomatal function, epicuticular wax and stem-root transition region of polyethylene glycol-treated and non treated *in vitro* grape plantlets. *In Vitro Cellular and Developmental Biology.-Plant*. 34: 1-7.
- BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, I. II.; KWIATKOWSKI, S.; CLARK, C. S. 1981. Leaf Anatomy and water stress of aseptically cultured “Pixy” plum grown under different environments. *Horticulture Science*. 16: 173-175.
- CAPELLADES, M.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH P. 1990. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. *The Journal of Horticultural Science*. 115: 141-145.
- DAMI, I.; HUGHES, H. G. 1995. Leaf anatomy and water loss of *in vitro* PEG-treated “Valiant” grape. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 42: 179-184.
- DAMI, I.; HUGHES, H. G. 1997. Effects of PEG-induced water stress on *in vitro* hardening of “Valiant” grape. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 47: 97-101.
- DE LA TORRE-ALMARÁZ, R.; SALAZAR-SEGURA, M.; VALVERDE R. A. 2003. Etiología del moteado amarillo del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* B) en México. *Agrociencia*. 37: 277-289.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. 1950. The water culture method of growing plants without soil. *California Agriculture Experiment Station Circular* 347.
- JAMISON, J. A.; RENFROE, M. H. 1998. Micropropagation of *Betula uber* (Ashe) Fernald. *In Vitro cell. Development Biology Plant*. 34:147-151.
- KOZAI, T. 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions, p. 467 – 469. *In: Micropropagation. Technology and application*. DEBERG, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (eds.). KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS. Dordrecht – Boston – London.
- MURASHIGE, S. T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*. 15: 473-497
- NOÉ, N.; BONINI, I. 1996. Leaf Anatomy of High-bush Blueberry Grown *in vitro* and during Acclimatization to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*. 38: 19- 25.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; ĚATSKY, J.; ŠESTÁK, Z. 1997. Photosynthesis in plants cultivated *in vitro*, p. 525-540. – *In Pessarak II Handbook of Photosynthesis*. Marcel Dekker (ed). New York – Bessel - Hong Kong.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; WILHELMOVÁ, N.; SYNKOVÁ, H.; ĚATSKY, J.; KREBS, D.; TICHÁ, I.; HANÁĚKOVÁ, B.; SNOPEK, J. 1998. Acclimation of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions as affected by application of abscisic acid Photosynthesis in plants cultivated *in vitro*, p. 525-540. – *In Pessarak II Handbook of Photosynthesis*. Marcel Dekker (ed). New York - Bessel - Hong Kong. *Journal of Experimental Botany*. 49:863-869.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLEČEK, P.; HASEL, D.; PLZÁKOVÁ, Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*. 42(4):481-497.
- ROBERTS, A. V.; SMITH E. F.; MOTTLEY J. 1990. The preparation of micropropagated plantlets for transfer to soil without acclimatization, p. 227-236. Vol. 6. *In: Methods in Molecular Biology. Plant Cell and Tissue Culture*. Jeffrey W. and Jhon M. Walker (eds.). New York USA.
- SALISBURY, B. F.; ROSS, W. C. 1994. *Plant Physiology*. 4^a Ed. Wadsworth Pub. USA. pp. 15-207.
- SANTAMARÍA, J. M.; DAVIES, W. J.; ATKINSON, C. J. 1993. Stomata of micropropagated *Delphinium* plants respond to ABA, CO₂, light and water potential, but fail to close fully. *Journal of Experimental Botany* 44(258): 99-107.
- SOBAYED S. M. A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. 1999. Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured *in vitro* under photoautotrophic photomixotrophic conditions. *In Vitro Cellular Developmental Biology.-Plant* 35: 183-188
- TICHÁ, I.; RADOCHOVÁ B.; KADLEČEK P. 1999. Stomatal morphology during acclimatization of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions. *Biologia Planarum*. 42 (3): 469-474.
- VENTURA, Z. E.; SALCEDO, M. G.; HERNÁNDEZ, L. A.; MARTÍNEZ, B. B.; JIMÉNEZ, A. A.; TREJO, T. G.; DE JESÚS, S. A.; VELÁZQUEZ, D. V. M. 2003. *In vitro* regeneration and acclimatization of plants of tumeric (*Curcuma longa* L.) in a hydroponic system. *Applied Biotechnol*. 20 (1): 25-31.