

Evaluasi Kuantitas dan Hiperhidrisitas Embrio Somatik Kakao Pada Kultur Padat, Kultur Cair, dan Subkultur Beruntun

Evaluation of Quantity and Hyperhydricity of Cocoa Somatic Embryo Obtained from Solid Culture, Liquid Culture, and Sequence Subculture

Sulistiyani Pancaningtyas^{1*)}

¹⁾Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jl. PB. Sudirman No. 90, Jember, Indonesia.

^{*)}Alamat penulis (*corresponding author*): listya.1606@gmail.com

Naskah diterima (*received*) 17 Oktober 2012, disetujui (*accepted*) 21 Desember 2012.

Abstrak

Penelitian yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh kultur pada media padat, media cair, dan subkultur beruntun terhadap kuantitas dan hiperhidrisitas embrio somatik kakao telah dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. Materi yang digunakan adalah kalus embriogenik, yang selanjutnya dikulturkan pada media ekspresi embrio somatik di media padat dan media cair dengan komposisi media yang sama, yaitu menggunakan media dasar MS dengan penambahan hormon Adenin (0,025 mg/L). Bahan pematat yang digunakan pada media padat adalah gelrit (3 g/L), dan klon yang digunakan adalah Sca 6. Penelitian terdiri atas dua kegiatan, yaitu 1) pengaruh jenis media kultur dan 2) pengaruh subkultur beruntun pada media padat. Parameter yang diamati adalah bobot massa kalus embriogenik, jumlah embrio somatik, ukuran embrio somatik pada berbagai tahap perkembangan embrio, yakni globular, torpedo, dan kotiledon, baik itu embrio normal maupun embrio yang mengalami hiperhidrisitas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi embrio somatik pada media cair lebih tinggi dibandingkan dengan media padat. Regenerasi embrio somatik pada kultur padat menghasilkan persentase embrio yang mengalami abnormalitas akibat hiperhidrisitas tertinggi pada fase kotiledon bening sebesar 60%. Sementara itu, regenerasi embrio somatik pada kultur cair menghasilkan persentase embrio yang mengalami abnormalitas akibat hiperhidrisitas tertinggi pada fase globular dan kotiledon bening sebesar 37%. Semakin sering dilakukan subkultur maka tingkat abnormalitas embrio akan semakin meningkat, sedangkan jumlah embrio semakin menurun.

Kata kunci: Kakao, hiperhidrisitas, embrio somatik, media padat, media cair, subkultur, *in vitro*.

Abstract

Research aimed to study the effect of solid culture, liquid culture, and sequence subculture on quantity and hyperhydricity of somatic embryo was carried out at Laboratory of Biotechnology, Indonesian Coffee and Cocoa Research Institute. Materials used in this study were embryogenic calli transferred on somatic embryos expression both in solid and liquid media with the same media composition, namely MS medium with the addition of Adenine (0.025 mg/L). Gelling agent used in solid media was gelrite (3 g/L). Clones used in this study was Sca 6. This research consisted of two trials, namely 1) effect of medium type (solid and liquid), and 2) sequence subculture (four

subcultures). This results showed that the production of somatic embryos in liquid medium was higher than in the solid medium. Regeneration of somatic embryos on solid medium culture showed the highest percentage of abnormality embryos due to hyperhydricity at the cotyledonary phase 60%. Meanwhile, the regeneration of somatic embryos in liquid culture showed the highest percentage of abnormality embryos due to hyperhydricity at the globular and cotyledonary phase 37%. Frequent subculture increased abnormal embryos and decreased the number of somatic embryos.

Key words: Cacao, hyperhydricity, somatic embryos, solid culture, liquid culture, subculture, in vitro.

PENDAHULUAN

Hiperhidrisitas adalah perubahan morfologi, anatomi dan fisiologi yang terjadi pada jaringan tanaman yang sering ditemukan pada perbanyakan tanaman secara kultur *in vitro* (Ziv, 1991). Hiperhidrisitas (sebelumnya dikenal sebagai vitrifikasi) adalah kelainan fisiologis yang menyebabkan hidrasi berlebihan, lignifikasi rendah, gangguan fungsi stomata dan berkurangnya kekuatan mekanik tanaman yang dihasilkan kultur jaringan. Secara umum, gejala utama hiperhidrisitas adalah karakteristik tanaman menjadi sukulen, ditandai dengan kekurangan klorofil dan kandungan air yang tinggi. Secara khusus, tipis atau kurangnya lapisan kutikula, berkurangnya jumlah sel palisade, letak stomata tidak teratur, dinding sel kurang berkembang dan besarnya ruang intraseluler di lapisan sel mesofil telah digambarkan sebagai beberapa perubahan anatomi yang berhubungan dengan hiperhidrisitas (Franck *et al.*, 2004).

Fenomena hiperhidrisitas banyak terjadi pada perbanyakan *in vitro* menggunakan kultur cair dan padat (Olmos, 2006). Terjadinya hiperhidrisitas dapat menyebabkan kehilangan hasil yang cukup signifikan dan masalah-masalah lain dalam perbanyakan secara komersial. Hiperhidrisitas telah banyak dipelajari pada pertumbuhan tanaman secara *in vitro* di antaranya kentang (Park *et al.*, 2004), lidah buaya (Ivanova *et al.*,

2006), anyelir (Saher *et al.*, 2004), dan bunga matahari (Mayor *et al.*, 2003). Hiperhidrisitas dapat disebabkan oleh konsentrasi sitokinin yang tinggi (Kadota *et al.*, 2001), kapasitas retensi air yang tinggi ketika botol tertutup rapat, konsentrasi bahan pematid yang rendah (Ivanova & van Staden, 2011), dan konsentrasi amonium yang tinggi (Franck *et al.*, 2004).

Hiperhidrisitas dapat dikendalikan dengan memodifikasi kondisi ruang/botol kultur. Mengatur kelembaban relatif dalam botol merupakan salah satu parameter yang penting untuk dikendalikan. Penggunaan *membrane permeable gas* dapat membantu, karena memungkinkan terjadi pertukaran uap air dan gas lain seperti etilen dengan lingkungan sekitarnya. Penggunaan bahan pematid pada konsentrasi yang tinggi dan dengan kekuatan lebih tinggi dapat mengurangi risiko hiperhidrisitas. Hiperhidrisitas juga dapat dikendalikan dengan pendinginan (Perez-Tornero, 2001), penggunaan sitokinin-meta-topolin, kombinasi kandungan sitokinin yang lebih rendah dan amonium nitrat, penggunaan nitrat atau glutamin sebagai sumber nitrogen tunggal dan penurunan rasio $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ dalam medium (Bairu *et al.*, 2007). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kultur padat dan cair terhadap kuantitas dan hiperhidrisitas embrio somatik kakao dan pengaruh subkultur beruntun terhadap kuantitas dan hiperhidrisitas embrio somatik kakao.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. Klon yang digunakan adalah Sca 6. Penelitian terdiri atas dua kegiatan, yaitu 1) Pengaruh jenis media kultur pada tahap ekspresi embrio somatik, dan 2) Pengaruh subkultur beruntun pada tahap ekspresi embrio somatik. Parameter yang diamati adalah bobot massa kalus embriogenik, jumlah embrio, ukuran embrio somatik pada berbagai tahap perkembangan embrio somatik, yakni globular, torpedo, dan kotiledon, baik itu embrio normal maupun embrio yang mengalami hiperhidrisitas.

Bahan penelitian yang digunakan adalah kalus embriogenik yang diperoleh dari tahap multiplikasi kalus embriogenik. Dalam penelitian ini difokuskan pada tahap ekspresi embrio somatik pada media padat dan media cair dengan komposisi media yang sama, yaitu menggunakan media dasar MS dengan penambahan hormon Adenin (0,025 mg/L). Bahan pematid yang digunakan pada media padat adalah gelrit (3 g/L).

Embrio somatik yang terbentuk selanjutnya dikulturkan selama empat minggu dalam kondisi gelap selama dua minggu dan terang selama dua minggu, dengan fotoperiodisitas 16 jam. Pengamatan dilakukan setiap satu minggu untuk parameter ukuran embrio, persentase embrio normal, persentase embrio yang mengalami hiperhidrisitas dan rata-rata jumlah embrio hasil perbanyakan. Untuk membandingkan tingkat multiplikasi dan pertumbuhan embrio somatik pada media padat dan media cair, dilakukan pengukuran bobot segar kalus embriogenik setelah dikulturkan selama enam minggu. Gejala hiperhidrisitas ditunjukkan dengan ciri-ciri hipokotil sukulen/transparan, warna hijau yang terbentuk pada tahap lebih lanjut (kecambah) lebih muda/pucat karena

kurangnya klorofil, dan morfologi embrio mengalami abnormalitas.

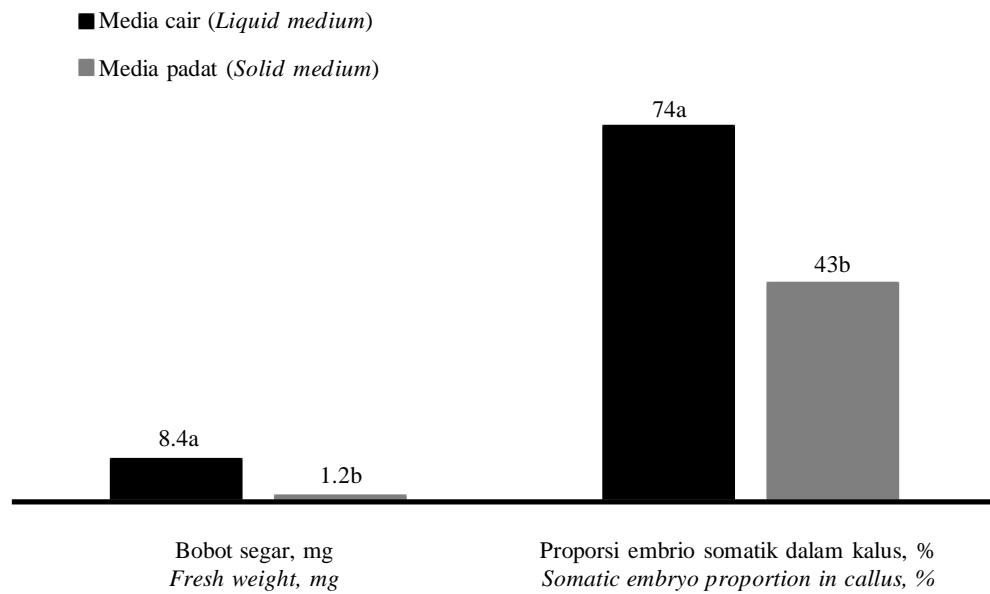
Pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diamati diuji dengan analisis ragam (*variance analysis*) dan apabila hasilnya nyata ($P < 0,05$) maka dilakukan uji lanjut dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

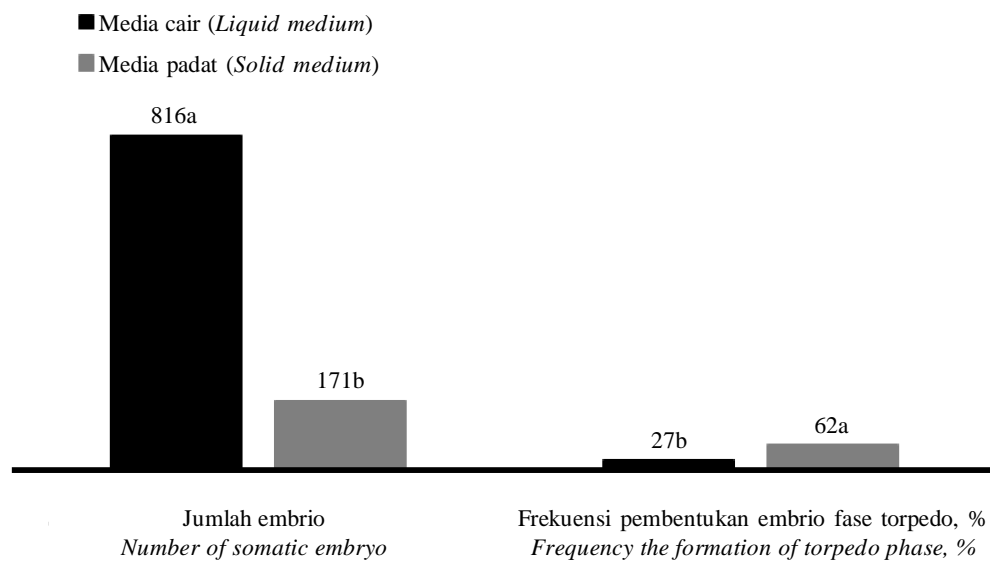
Dalam penelitian ini, selama periode kultur empat minggu dilakukan perbandingan terhadap metode perbanyakan embrio somatik kakao yaitu menggunakan media padat dan media cair. Perbandingan tersebut untuk mengetahui bobot segar biomassa, jumlah dan morfologi embrio. Hasil tersebut disajikan pada Gambar 1 dan 2.

Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa bobot segar biomassa kalus, jumlah dan morfologi embrio berbeda nyata antara kultur pada media padat dan media cair. Rata-rata bobot segar biomassa pada media cair adalah 8,4 mg sedangkan pada media padat adalah 1,2 mg (Gambar 1). Bobot tersebut diperoleh dari hasil proliferasi kalus embriogenik ± 1 mg pada awal kultur. Lebih lanjut, proporsi embrio somatik yang terbentuk dalam kalus setelah regenerasi pada media cair mencapai 74%, sedangkan pada media padat mencapai 43%. Jumlah embrio dalam satu populasi adalah 816 embrio pada media cair dan 171 embrio pada media padat, dengan frekuensi pembentukan embrio fase torpedo sekitar 27% pada media cair dan 62% pada media padat (Gambar 2).

Dari penelitian ini diperoleh hasil bahwa pada media cair embrio somatik fase globular berkembang lebih dominan dibandingkan dengan embrio somatik fase torpedo. Data pada Gambar 1 & 2 menunjukkan bahwa regenerasi menggunakan media cair meng-



Gambar 1. Produksi biomassa dan proporsi embrio somatik dalam kalus setelah empat minggu kultur.
Figure 1. Biomass production and somatic embryo proportion in the callus after four weeks of culture.



Gambar 2. Produksi embrio somatik dan frekuensi pembentukan embrio fase torpedo setelah empat minggu kultur.
Figure 2. Somatic embryo production and frequency of torpedo phase formation after four weeks of culture.

hasilkan lebih banyak embrio somatik dibandingkan dengan media padat. Hal ini dapat dikatakan bahwa penggunaan metode kultur yang berbeda antara media padat dan media cair, secara signifikan menghasilkan bobot segar biomassa, proporsi embrio yang terbentuk, jumlah embrio dalam satu populasi, dan frekuensi pembentukan embrio fase torpedo yang berbeda pula. Dengan demikian dapat dijelaskan bahwa jenis media kultur dalam penelitian ini dapat mempengaruhi kualitas dan kuantitas embrio somatik kakao.

Saat ini, perbanyak tanaman kakao untuk memproduksi klon-klon unggul dapat dilakukan dengan teknologi somatik embriogenesis. Hal ini dimungkinkan untuk produksi dalam skala besar pada berbagai genotipe (Maximova *et al.*, 2002). Namun demikian, penerapan teknologi perbanyak menggunakan media padat ini periode kultur cukup lama dalam menghasilkan embrio (6-8 bulan), dan memerlukan biaya per tanaman relatif tinggi (Traore *et al.*, 2003).

Dalam penelitian ini diketahui bahwa tingkat produksi embrio somatik kakao menggunakan media padat relatif rendah.

Hal ini dikarenakan hanya sedikit embrio yang dapat dihasilkan dari kalus embriogenik. Hal serupa juga telah dihasilkan Maximova *et al.* (2002) dan Niemenak *et al.* (2008) menggunakan klon yang sama yaitu Sca 6 dapat memproduksi $10,2 \pm 1,9$ embrio per eksplan setelah kultur selama 12 bulan dengan menggunakan media padat.

Diketahui bahwa pada media padat (Tabel 1), jumlah embrio somatik bening/transparan lebih tinggi dibandingkan dengan embrio yang normal berwarna putih tulang. Jumlah tertinggi diperoleh pada embrio somatik fase globular bening. Namun apabila dilihat dari morfologi embrio somatik, persentase embrio tertinggi yang mengalami abnormalitas adalah pada fase kotiledon bening yaitu 60%. Ukuran embrio pada setiap fase, baik embrio somatik berwarna putih maupun yang bening tidak berbeda, yaitu embrio somatik fase globular berukuran 0,1 mm, torpedo 0,40-0,43 mm dan fase kotiledon berukuran 0,7 mm. Embrio somatik yang bening mempengaruhi pertumbuhan dan morfologi embrio, bahwa tingkat

Tabel 1. Morfologi dan jumlah embrio somatik pada kultur media padat

Table 1. Morphology and number of somatic embryos in solid medium culture

Fase embrio somatik <i>Somatic embryo stages</i>	Parameter pengamatan (<i>Observed parameters</i>)		
	Jumlah embrio somatik <i>Number of somatic embryos</i>	Embrio somatik abnormal <i>Abnormality of somatic embryos</i> (%)	Ukuran embrio somatik <i>Size of somatic embryos</i> (mm)
Globular putih <i>White globular</i>	3.67 d	10.67 c	0.10 c
Torpedo putih <i>White torpedo</i>	2.33 d	13.67 c	0.40 b
Kotiledon putih <i>White cotyledon</i>	2.67 d	6.33 c	0.70 a
Globular bening <i>Transparent globular</i>	68.33 a	7.33 c	0.10 c
Torpedo bening <i>Transparent torpedo</i>	25.67 b	27.67 b	0.43 b
Kotiledon bening <i>Transparent cotyledon</i>	18.67 c	60.00 a	0.70 a

Catatan (*Note*): Angka-angka dalam kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan pada taraf 5% (*Figures in the same column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan test at 5% level*).

abnormalitas embrio juga tinggi. Hal ini dapat disebabkan karena embrio yang bening telah mengalami hiperhidrisitas. Embrio yang mengalami hiperhidrisitas akan terganggu pertumbuhannya karena tidak berfungsi meristem primer, dan terkadang menyebabkan kematian pucuk karena nekrosis (Gaspar *et al.*, 1991).

Produksi embrio somatik pada media padat menunjukkan keragaman fase embrio (Gambar 3), bahwa jumlah embrio yang berkembang (torpedo dan kotiledon) lebih tinggi dibandingkan dengan embrio fase globular (Tabel 1). Ketidaksesuaian pertumbuhan embrio akan menghambat pertumbuhan embrio pada fase yang lebih awal (globular), sehingga tingkat abnormalitas embrio pada tahap perkembangan lebih lanjut menjadi fase torpedo maupun kotiledon akan tinggi. Meskipun pada tahapan perkembangan embrio yang lebih lanjut, embrio bening akan berubah menjadi embrio yang berwarna putih, tetapi tidak terjadi perubahan morfologi embrio yang telah mengalami abnormalitas. Hal ini disebabkan embrio mengalami defisiensi dinding sel atau deposisi selulosa dan lignin (Kevers *et al.*, 1988). Penambahan konsentrasi bahan pematat diharapkan dapat mengurangi

embrio yang abnormal akibat hiperhidrisitas. Menurut Ivanova & van Staden (2011), penggunaan gelrit secara signifikan menghasilkan tingkat multiplikasi yang rendah dan meningkatkan hiperhidrisitas empat kali lebih tinggi (65%) dibandingkan dengan pematat agar. Gelrit dinyatakan dapat mendorong dan mempercepat hiperhidrisitas pada beberapa spesies (Franck *et al.*, 2004; Tsay *et al.*, 2006). Namun demikian, hiperhidrisitas dapat diatasi dengan meningkatkan konsentrasi gelrit hingga 16 g/L.

Dari penelitian ini dapat dijelaskan bahwa proses produksi embrio somatik kakao dapat dilakukan dengan kultur cair dan kultur padat. Namun, untuk tujuan produksi tanaman dalam skala banyak atau untuk komersialisasi dibutuhkan suatu metode yang lebih efisien untuk multiplikasi kalus embriogenik, yaitu menggunakan media cair. Umumnya, sistem kultur cair lebih diterima untuk sistem otomatisasi untuk mendapatkan hasil yang lebih baik dalam pertumbuhan yang cepat dan tingkat perbanyakan yang lebih tinggi. Namun, sistem ini terkadang memiliki kendala dalam penggunaannya karena terjadi abnormalitas secara fisiologi, khususnya hiperhidrisitas (Preil, 2005).



Gambar 3. Morfologi embrio somatik pada kultur media padat (A = normal, B = abnormal).

Figure 3. Morphology of somatic embryo in solid medium culture (A = normal, B = abnormal).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi embrio somatik menggunakan media cair menghasilkan jumlah embrio somatik cukup tinggi untuk masing-masing fase perkembangan embrio. Namun demikian, jumlah embrio somatik tertinggi diperoleh pada fase globular. Dari satu populasi kalus embriogenik dihasilkan berturut-turut sebanyak 105 dan 235 embrio somatik fase globular putih dan bening. Persentase embrio somatik abnormal paling rendah ditunjukkan oleh embrio somatik fase kotiledon berwarna putih yaitu 6,67%. Ukuran embrio somatik pada masing-masing fase perkembangan tidak berbeda nyata, kecuali pada fase kotiledon. Ukuran embrio somatik fase kotiledon berwarna putih adalah 0,70 mm dan fase kotiledon bening adalah 1,03 mm. Hal ini dikarenakan embrio somatik pada fase kotiledon berwarna bening sebagian besar sudah memiliki radikula (calon akar).

Pada penelitian ini diketahui bahwa produksi embrio somatik pada media cair menghasilkan jumlah yang lebih banyak dibandingkan pada media padat dengan

morfologi pertumbuhan embrio yang lebih seragam, yaitu sebagian besar pada fase globular (Gambar 4). Terjadinya hiperhidrisitas pada kultur media cair memang tidak dapat dihindari, akan tetapi dapat dikurangi melalui beberapa cara di antaranya dengan memodifikasi kondisi atmosfer pada lingkungan kultur, metode pengendalian secara fisik dan kimiawi (Olmos, 2006), serta mengurangi intensitas perendaman dan subkultur pada media cair.

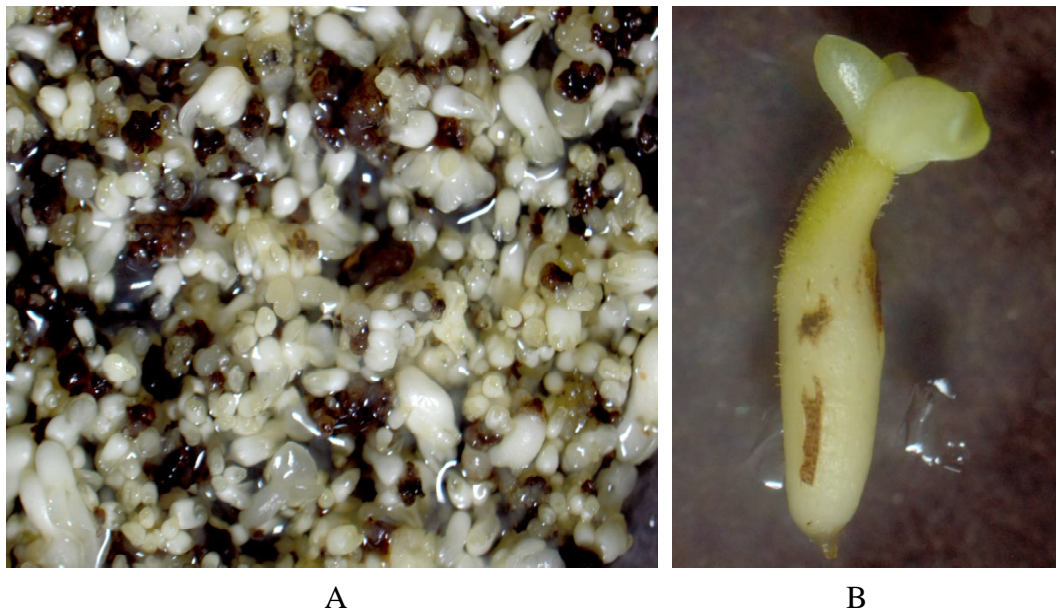
Dalam penelitian ini juga dipelajari pengaruh subkultur beruntun massa kalus embriogenik pada media padat terhadap terjadinya embrio somatik abnormal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan subkultur menurunkan jumlah embrio somatik tetapi meningkatkan massa kalus maupun embrio somatik yang mengalami hiperhidrisitas (abnormal). Semakin sering dilakukan subkultur maka semakin tinggi abnormalitas embrio somatik. Hal yang sama terjadi pada parameter massa kalus, yaitu semakin sering dilakukan subkultur maka semakin tinggi massa kalus yang dihasilkan (Gambar 5).

Tabel 2. Morfologi dan jumlah embrio somatik pada media cair

Table 2. Morphology and number of somatic embryos in liquid medium culture

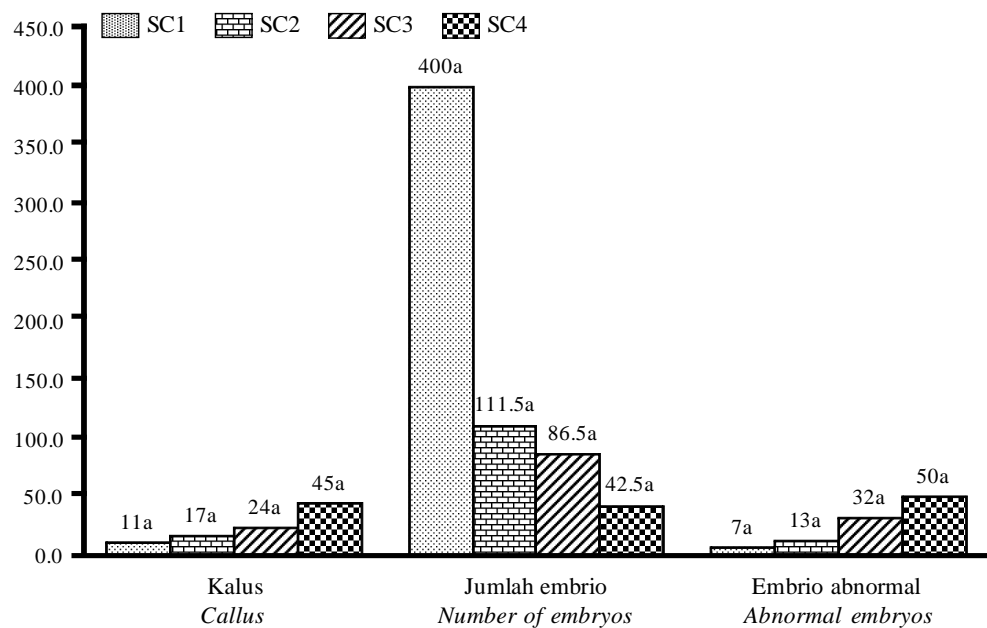
Fase embrio somatik <i>Somatic embryo stages</i>	Parameter pengamatan (<i>Observed parameters</i>)		
	Jumlah embrio somatik <i>Number of somatic embryos</i>	Embrio somatik abnormal <i>Abnormal somatic embryos</i> (%)	Ukuran embrio somatik <i>Size of somatic embryos</i> (mm)
Globular putih <i>White globular</i>	105 ab	15.00 c	0.10 d
Torpedo putih <i>White torpedo</i>	43.33 b	16.67 c	0.47 c
Kotiledon putih <i>White cotyledon</i>	27.33 b	6.67 d	0.70 b
Globular bening <i>Transparent globular</i>	234.67 a	37.00 a	0.10 d
Torpedo bening <i>Transparent torpedo</i>	5.67 b	26.33 b	0.53 c
Kotiledon bening <i>Transparent cotyledon</i>	15.00 b	37.00 a	1.03 a

Catatan (*Note*): Angka-angka dalam kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan pada taraf 5% (*Figures in the same column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan test at 5% level*).



Gambar 4. Morfologi embrio somatik pada media cair (A = embrio somatik pada suspensi kalus embriogenik, B = embrio fase kecambah).

Figure 4. Morphology somatic embryo on liquid medium (A = somatic embryos on suspension of embryogenic calli, B = cotyledonary phase embryo).



Gambar 5. Pengaruh subkultur beruntun terhadap produksi kalus, kuantitas dan hiperhidrisitas embrio somatik.

Figure 5. Effect of sequence subculture on callus production, quantity and hyperhydricity of somatic embryo.

Keterangan (Notes): SC = subkultur. Angka-angka dalam kelompok yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf uji Duncan pada taraf 5% (SC = subculture. Figures in the same group followed by the same letter are not significantly different to Duncan at 5% level).

Teisson & Alvard (1995) menyatakan bahwa frekuensi perendaman dalam media cair dapat mendorong produksi embrio. Namun demikian perbanyakannya menggunakan media cair selain dapat mendorong multiplikasi embrio somatik kakao juga menimbulkan terjadinya dampak negatif karakter morfologi seperti hiperhidrisitas. Hal ini dapat dihindari dengan mengurangi waktu kultur dalam media cair, karena semakin lama jaringan tanaman terkena media cair, maka akan menjadi penyebab terjadinya hiperhidrisitas (Albarran *et al.*, 2005). Hal serupa juga dapat dilihat pada Gambar 5, bahwa dengan semakin sering dilakukan subkultur, maka tingkat abnormalitas embrio juga akan meningkat. Embrio dengan tingkat abnormalitas yang rendah, secara morfologi dan fisiologi kualitas embrionya baik, sehingga dapat tumbuh menjadi tanaman normal (planlet) dan tingkat kematian saat diaklimatisasi menjadi rendah. Embrio somatik yang mengalami abnormalitas akibat hiperhidrisitas, akan kehilangan kemampuan untuk menghasilkan kecambah normal.

KESIMPULAN

Dari serangkaian penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Produksi embrio somatik kakao pada media cair lebih tinggi dibandingkan dengan media padat.
2. Regenerasi embrio somatik pada kultur padat menghasilkan persentase embrio dengan abnormalitas akibat hiperhidrisitas tertinggi pada fase kotiledon bening (60%), sedangkan regenerasi embrio somatik pada kultur cair menghasilkan persentase embrio dengan tingkat hiperhidrisitas tertinggi pada fase globular dan kotiledon bening (37%).
3. Semakin sering dilakukan subkultur maka tingkat abnormalitas embrio somatik dan produksi massa kalus semakin meningkat.

DAFTAR PUSTAKA

- Albarran, J.; B. Bertrand; M. Lartaud & H. Etienne (2005). Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 81, 27–36.
- Bairu, M.; W. Stirk; K. Dolezal & J. van Staden (2007). Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: Can metatopolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin?. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 90, 15–23.
- Franck, T.; C. Kevers; T. Gaspar; J. Dommes; C. Deby; R. Greimers; D. Serteyn & G. Deby-Dupont (2004). Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 519–527.
- Ivanova, M. & J. van Staden (2011). Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 104, 13–21.
- Ivanova, M.; O. Novak; M. Strnad & J. van Staden (2006). Endogenous cytokinins in shoots of *Aloe polyphylla* cultured in vitro in relation to hyperhydricity, exogenous cytokinins and gelling agents. *Plant Growth Regulation*, 50, 219–230.
- Kadota, M.; K. Imizu & T. Hirano (2001). Double-phase in vitro culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. *Science Horticulture*, 89, 207–215.
- Kevers, C.; R. Goldberg; J. Chu-Ba & T. Gaspar (1988). Composition of the walls of stem and leaves of vitrifying carnation. *Biologia Plantarum*, 30, 219–223.
- Maximova, S.N.; L. Alemano; A. Young; N. Ferriere; A. Traore & M.J. Guiltinan (2002). Efficiency, genotypic variabi-

- lity, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*, 38, 252–259.
- Mayor, M.L.; G. Nestares; R. Zorzoli & L.A. Picardi (2003). Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 72, 99–103.
- Niemenak, N.; K. Saare-Surminski; C. Rohsius; D.O. Ndoumou & R. Leiberei (2008). Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Cell Biology and Morphogenesis*, 27, 667–676.
- Olmos, E. (2006). Prevention of hyperhydricity in plant tissue culture. p. 285–288. **In:** J.A. Teixeira da Silva (Ed.). *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*. Spain.
- Park, S.W.; J.H. Jeon; H.S. Kim; Y.M. Park; C. Aswath & H. Joung (2004). Effect of sealed and vented gaseous micro-environment on hyperhydricity of potato shoot in vitro. *Science Horticulture*, 99, 199–205.
- Preil, W. (2005). General introduction: A personal reflection on the use of liquid media for in vitro culture. p. 1–18. **In:** A.K. Hvoslef-Eide & W. Preil (Eds.). *Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation*. Springer, Berlin.
- Saher, S.; A. Piqueras; E. Hellin & E. Olmos (2004). Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Plant Physiology*, 120, 152–161.
- Teisson, C. & D. Alvard (1995). A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion. p. 105–110. **In:** M. Terzi *et al.* (Eds.). *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Traore, A.; S. Maximova & M. Guiltinan (2003). Micropropagation of *Theobroma cacao* using somatic embryo derived plant. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*, 39, 332–337.
- Tsay, H-S.; C-Y. Lee; D.C. Agrawal & S. Basker (2006). Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* a medicinal plant. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*, 42, 445–449.
- Ziv, M. (1991). Vitrification: Morphological and physiological disorder of in vitro plant. p. 45–69. **In:** P.G. Debergh & R.H. Zimmerman (Eds.). *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- *****.