

ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E CONTROLE DA HIPERHIDRICIDADE NA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

MORPHOPHYSIOLOGICAL ASPECTS AND HYPERHYDRICITY CONTROL IN PLANT TISSUE CULTURE

Denise Palma^{1*}; Adilson Ricken Schuelter²; Suzana Stefanello³; Andréa Maria Teixeira Fortes⁴.

RESUMO

As condições de cultivo de *in vitro*, associadas à história evolutiva das espécies, podem causar hiperhidricidade, com consequente perda nas brotações. Assim, torna-se necessário elucidar as causas da hiperhidricidade e alterações morfofisiológicas de plantas hiperhídricas, de maneira a estabelecer protocolos visando seu controle. O presente trabalho buscou pesquisar, com base em investigação bibliográfica, as alterações morfofisiológicas em plantas hiperhídricas e as alternativas para controlar este processo.

Palavras chave: micropropagação, morfofisiologia, vitrificação.

ABSTRACT

Conditions in *in vitro* culture, plus the species evolutionary history can cause hyperhydricity, which consequent sprouting loss. Thus, it is necessary to elucidate the hyperhydricity causes and morphophysiological changes in hyperhydric plants, in order to establish protocols to control. Thus, this study aimed at recording, based on bibliographic research, physical and physiological changes hyperhydricity plants and alternatives to control this process.

Key words: micropropagation, morphophysiology, vitrification.

INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos vegetais baseia-se na capacidade da totipotência das células a partir de um explante (célula ou qualquer fragmento de tecido ou órgão), permitindo a propagação de células ou

organismos, obtendo-se uma nova planta geneticamente idêntica à ancestral (TORRES et al., 2000).

Esta técnica vem sendo utilizada na multiplicação de espécies de difícil propagação, como aquelas com processo de desenvolvimento de frutos prolongado ou que apresentam dormência de sementes (ANDRADE, 2002; RIBAS et al., 2005); na limpeza clonal (FERREIRA et al., 1998; FIGUEIREDO et al. 2008); na obtenção de genótipos produtores de compostos

medicinais (COSTA et al. 2007; SIMÕES, 1988); na conservação e no intercâmbio de germoplasma; na propagação comercial de plantas com potencial econômico (TORRES et al., 1998) e como ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento vegetal (ANGRA et al. 1999; CARVALHO et al., 2007; DANTAS et al., 2001; LATADO et al., 2002).

A otimização do tempo de cultivo e a obtenção de características genéticas esperadas dependem do estabelecimento de um protocolo que combine adequadamente os fatores da composição do meio de cultura e condições de cultivo (KERBAUY, 1997). Uma desordem em qualquer destes fatores pode culminar em alterações morfofisiológicas nocivas ao desenvolvimento da planta.

Uma importante desordem é a hiperhidricidade, reportada pela primeira vez em 1981 por Debergh e colaboradores como 'vitrificação', termo substituído por 'hiperhidricidade' pelos mesmos pesquisadores em 1992 (IVANOVA & STADEN, 2009). Neste estado a planta apresenta desordens morfológicas e fisiológicas decorrentes do elevado teor de água no interior das células e tecidos (ZIV, 1991), podendo atingir 60% dos brotos micropropagados (ZIV, 1991; FONTES, 1998; PARK et al., 2004).

Plantas hiperhídricas caracterizam-se morfológicamente por apresentarem aspecto

¹Bióloga, especialista em Biotecnologia aplicada a Agricultura e ao Meio Ambiente, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Rua Universitária, 1619 - Caixa Postal 701, CEP 85819-110, Jardim Universitário, Cascavel, PR, Brasil. E-mail: palmadenise@yahoo.com.br

²Doutor em Genética e Melhoramento, docente da Universidade Paranaense, Laboratório de Biotecnologia, Campus Toledo, Toledo, PR e pesquisador da Empresa Du Pont/Divisão Pioneer Sementes, Sorriso, MT.

³Doutora em Genética e Melhoramento, docente da Universidade Paranaense, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Campus Toledo, Toledo, PR.

⁴Bióloga, professor adjunto da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Cascavel, PR.

(Recebido para Publicação em 30/11/2009, Aprovado em 08/08/2011)

translúcido, caules largos e engrossados em diâmetro e com entrenós mais curtos que os de plantas normais, órgãos menos verdes e facilmente quebráveis, menor formação de raízes ou o não enraizamento, hipertrofia do mesófilo e do córtex do caule, hipertrofia das células, maiores espaços intercelulares, falta de cera cuticular, folhas grossas, frágeis, alongadas e/ou enrugadas e com alterações na densidade e distribuição dos estômatos, nas células-guarda, no número e espessura das camadas da epiderme e do tecido parenquimático e nas estruturas de defesa mecânica e química, além de desorganização dos tilacóides e baixo número de granas, menor número de cloroplastos e menor quantidade de clorofila (DEBERGH et al., 1981; FONTES et al., 1999; FRANCK et al., 1998; GASPER et al., 1991; KEVERS et al., 2004; KEVERS et al., 1984; OLMOS & HELLÍN, 1998; SAEBO, et al. 1995; ZIV, 1991).

A ausência de cera epicuticular, a anormalidade estomática, o reduzido desenvolvimento de tecido paliádico (PICOLI et al., 2001) e o não funcionamento dos estômatos causam perda hídrica e dessecação em plantas transferidas para condições *ex vitro* (DEBERGH et al., 1992), fazem com que o explante não sobreviva à aclimação, fase muito importante da micropropagação (BERTONI et al., 2006), além de afetar a sobrevivência e adaptação das plantas após sua transferência para o solo, implicando no aumentando da suscetibilidade à contaminação por fungos e produtos químicos (REUTHER, 1990 Apud RADMANN et al., 2001).

O presente trabalho buscou realizar uma investigação bibliográfica a fim de descrever as alterações fisiológicas de plantas hiperhídricas e as alternativas para controlar este processo.

DESENVOLVIMENTO

Fatores que favorecem a ocorrência de hiperhidricidade

Dentre os fatores internos que causam hiperhidricidade estão as condições de estresse (ZIV, 1991; SAHER et al., 2004), devidas, por exemplo, aos estados físico e químico do meio de cultura e da atmosfera dos frascos, que podem resultar em acúmulo de vapor de água, gás carbônico e etileno, e causar hiperhidricidade independente da origem do explante. A presença de reguladores de crescimento, grandes quantidades de íons amônio (NH_4^+) e cloreto (Cl^-), tipo e concentração de agentes gelificantes e alta umidade relativa nos frascos de cultivo são fatores que desencadeiam hiperhidricidade (ZIV, 1991; HAN et al., 1996; MAJADA et al., 1997; PARK et al., 2004).

A maior incidência de hiperhidricidade em meio líquido do que em meio sólido tem sido atribuída ao baixo conteúdo de oxigênio, ausência de trocas gasosas e supressão da respiração (GEORGE, 1993).

Assim, a hiperhidricidade encontra-se ligada à concentração de agente gelificante no meio de cultivo.

Em meio líquido, brotos de *Psoralea corylifolia* exibiram hiperhidricidade, independente da concentração e combinação de reguladores de crescimento utilizados, o que ocorre, provavelmente, devido o contínuo contato do tecido vegetal com o meio. A transferência dos brotos para um meio solidificado pode controlar a hiperhidricidade (BASKARAN & JAYABALAN, 2009).

Além da consistência do meio, o tipo de agente gelificante também pode influenciar na hiperhidricidade. Em micropropagação de *Aloe polyphylla*, o uso de gelrite resultou em uma multiplicação significativamente baixa e taxa de hiperhidricidade aproximadamente quatro vezes maior em comparação com o meio contendo agar (IVANOVA & STADEN, 2011).

A baixa ocorrência de hiperhidricidade em meio solidificado com agar tem sido sugerida devido uma galactana sulfatada em sua composição, apta para controlar hiperhidricidade. Já o efeito do gelrite tem sido atribuído a sua estrutura física, a qual permite um acréscimo na absorção de substâncias como citocininas, NH_4^+ e água, causadores de hiperhidricidade. No entanto, o efeito do agente gelificante na proliferação parece ser espécie-específico e depender da otimização de outros fatores, como a concentração de citocininas (IVANOVA & STADEN, 2011).

As citocininas são acrescidas ao meio de cultivo para regular o balanço hormonal, o que é dependente da fase do cultivo e da demanda de cada espécie. Normalmente, para a produção de gemas e múltiplos brotos utiliza-se um meio rico em citocinina. No entanto, a escolha dos reguladores de crescimento é dependente da espécie vegetal a ser micropropagada e do tipo de explante utilizado (INÁCIO, 2010).

O excesso de citocinina no meio de cultura é tóxico às plantas e promotor de hiperhidricidade (LESHEM et al., 1988). O efeito das citocininas na incidência de hiperhidricidade em *Aloe polyphylla* depende das concentrações de outros componentes do meio e da espécie vegetal em questão. A hiperhidricidade induzida por citocininas pode ser mais difícil de ser revertida, desde que o regulador de crescimento seja necessário para a proliferação. Aumentando as concentrações de zeatina e benziladenina (BA), ocorre aumento na taxa de hiperhidricidade. Já o efeito do tidiazuron (TDZ) parece ser espécie-específico e seu uso resultou em baixa regeneração de brotos e alta hiperhidricidade, independente da concentração de gelrite utilizada (IVANOVA & STADEN, 2011).

A hiperhidricidade ocorre com maior frequência quando se utiliza concentrações de N-6 benzilaminopurina (BAP) acima de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ (GUERRA & NODARI, 2006). No entanto, em

concentração de BAP de 1 mg L⁻¹, explantes de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* sofreram oxidação e hiperhidricidade (BRONDANI et al., 2009), ao passo que à concentração de 5,0 µM de CIN na ausência de ANA ocorreu a mais alta taxa de hiperhidricidade (49,5%) na espécie ornamental mosquitinho (*Gypsophila paniculata* L.) (QUORIN et al., 2008).

As citocininas são derivadas da base nitrogenada adenina e seus efeitos fisiológicos na planta estão relacionados com a divisão, o alongamento e a diferenciação celular, o retardamento da senescência, a dominância apical, a germinação e a quebra de dormência de sementes (TAIZ & ZEIGER, 2004). A adição de adenina na forma de sulfato de adenina é muito utilizada em meios de cultura de tecidos vegetais, sendo que seu efeito pode ser comparado ao de uma citocinina fraca ou ainda haver uma interação com as próprias citocininas no meio (TORRES et al., 1998).

Níveis de sulfato de adenina foram testados na multiplicação *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01', sendo que na maior concentração utilizada (120 mg L⁻¹) os segmentos nodais apresentaram hiperhidricidade (SCHMILDT et al., 2007).

Além das citocininas, a razão amônio:nitrato no meio está relacionada com a taxa de hiperhidricidade (HAN et al. 1991 a, b). Utilizando amônio como única fonte de Nitrogênio na regeneração de brotos de *Aloe polyphylla* ocorreu intensificação da frequência de hiperhidricidade. Quando nitrato foi usado como única fonte de N a hiperhidricidade foi completamente eliminada. O uso de glutamina como única fonte de N resultou em produção de brotos de boa qualidade e quase nada de hiperhidricidade (IVANOVA & STADEN, 2009).

A adição de citocininas (BA, zeatina ou TDZ) em meio com altas concentrações de NH₄⁺ aumentou a hiperhidricidade de maneira concentração-dependente, sugerindo que elas foram capazes de induzir a síndrome em *Aloe Polyphylla* somente quando outros fatores no sistema de cultura não são otimizados (IVANOVA & STADEN, 2008).

Em meio contendo citocininas, a adição de auxinas frequentemente aumenta a proporção de plantas hiperhídricas. Em experimento com *C. regium*, ao aumentar a concentração da auxina ácido indol butírico (AIB), aumenta-se a porcentagem de hiperhidricidade dos explantes (INÁCIO, 2010).

Outro fator que desencadeia a hiperhidricidade é a concentração de sais presente no meio de cultura (DEBERGH, 1981). Durante a multiplicação do porta-enxerto de *Prunus* sp. 'GxN-9', o meio MS proporcionou explantes com maior frequência de sintomas iniciais de hiperhidricidade do que em meio MS reduzido. A ocorrência dessa anormalidade, provavelmente, está associada à maior concentração salina no meio MS (RADMANN et al., 2009).

O excesso de cloro é uma das causas de hiperhidricidade em porta-enxerto de videira, utilizando-se meios de cultura com dosagens de 750 a 1000 mg L⁻¹ de cloreto de sódio (VILLA et al., 2008 a) e em folhas de amoreira-preta micropropagadas sob diferentes concentrações de fosfato de sódio e de cloreto de potássio (VILLA et al., 2008 b). Segundo estes pesquisadores, os efeitos negativos dos íons Na²⁺ e Cl⁻ estão relacionados ao efeito osmótico, o qual induz condição de estresse hídrico às plantas e ao efeito tóxico direto, principalmente sobre os sistemas enzimáticos e de membranas.

Os tipos de explantes utilizados nas técnicas de cultivo *in vitro* também podem influenciar as respostas morfológicas. Meristemas apicais de *Scrophularia yoshimurae* resultaram em maior número de brotos hiperhídricos do que segmentos nodais, nas mesmas condições de cultivo (TSAY et al., 2006). Embora melhores resultados de brotação tenham sido obtidos utilizando-se explantes basais, 55% destes estavam hiperhídricos, ao passo que com a utilização de explantes apicais não se observou esta anormalidade (RADMANN et al., 2009). Os autores atribuem este fato à menor necessidade de BAP exigida por explantes basais para a indução de brotações, sendo a concentração utilizada tóxica, levando conseqüentemente a hiperhidricidade.

Fatores externos como temperatura e luminosidade também são responsáveis pelo fenômeno da hiperhidricidade.

A irradiância luminosa e a temperatura influenciam a hiperhidricidade das brotações da flor mosquitinho, uma vez que houve períodos de alta temperatura e outros de baixa luminosidade em virtude de problemas nos equipamentos que mantêm as condições ambientais da sala de crescimento (QUOIRIN et al., 2008).

A ausência de trocas gasosas entre o ambiente interno dos frascos de cultivo e o meio externo contribui para modificações dramáticas da composição gasosa nos frascos, como o acúmulo de produtos voláteis que podem inibir o crescimento das plantas e a fotossíntese (PARK et al., 2004). A ventilação dos frascos faz com que ocorra redução da umidade *in vitro*, aumento das trocas gasosas com a atmosfera e decréscimo na disponibilidade de água, reguladores de crescimento e nutrientes do meio (HAN et al., 1996). Além disso, grande quantidade de CO₂ é liberada durante o crescimento dos tecidos, podendo afetar significativamente a transpiração, a fotossíntese e estimular a biossíntese de etileno, um indutor de hiperhidricidade. Assim, um pré-requisito essencial para superar a hiperhidricidade é remover os gases acumulados no meio de cultivo (IVANOVA & STADEN, 2010).

Outro fator que contribui para a ocorrência de hiperhidricidade é a umidade relativa do ar da sala de crescimento. Ambientes com elevado índice de

umidade favorecem a hiperhidricidade. A não ocorrência de hiperhidricidade durante micropropagação de Ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] pode ser atribuída a manutenção da umidade relativa do ar do ambiente em torno de 60% (ALVES et al., 2010).

Características morfofisiológicas de plantas hiperhídricas

As alterações morfológicas em plantas hiperhídricas levam a importantes alterações fisiológicas. Estas últimas estão relacionadas a desordens na taxa fotossintética, inibição da síntese de celulose e lignina e distúrbios nas concentrações e atividades de enzimas e fitormônios, acarretando sérios problemas de desenvolvimento e adaptação da planta.

Quando as plantas são expostas a temperaturas elevadas ocorrem desequilíbrios na relação fotossíntese-respiração em que, sob temperaturas acima do ponto de compensação, a fotossíntese não pode repor o carbono usado como substrato para a respiração. Como consequência, as reservas de carboidratos diminuem. Além disso, altas temperaturas fazem com que muitas proteínas tornem-se estendidas ou mal dobradas, levando à perda da estrutura e da atividade enzimática (TAIZ & ZEIGER, 2004).

O déficit de oxigênio no ambiente das raízes faz cessar o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa, afetando a produção de ATP e, conseqüentemente, os processos metabólicos essenciais. A anóxia ou hipóxia são responsáveis por acelerar a produção de ácido abscísico e 1-aminociclopropano-1 ácido carboxílico (ACC) nas raízes, precursor de etileno (TAIZ & ZEIGER, 2004).

OLIVEIRA et al. (2008) determinaram atividade enzimática da peroxidase, em média, 55% maior em plantas hiperhídricas de picão-preto (*Bidens pilosa* L.) em relação às normais. Segundo FRÁGUAS (2006) a peroxidase é efetiva na resposta ao estresse ambiental.

As peroxidases estão relacionadas à resposta aos estresses físico, químico e biológico e sua atividade pode ser identificada como um marcador bioquímico de estresse (PIZA et al., 2003). Este aumento na atividade de peroxidases em plantas pode permitir maior tolerância ao estresse salino (MITTAL & DUBEY, 1991) e reduzir ou prevenir danos celulares causados por radicais livres e pela peroxidação dos lipídios (CHANG & KAO, 1998).

As atividades de algumas enzimas são maiores em brotos hiperhídricos de cravo (*Dianthus caryophyllus*) (SAHER et al., 2004). Por outro lado, pode haver diminuição na atividade de algumas enzimas envolvidas na glicólise (hexoquinase, hexose fosfato isomerase, glicerol-3-fosfato desidrogenase,

fosfofrutoquinase) e na via das pentoses fosfato (6-fosfogluconato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase), em brotos hiperhídricos de cerejeira (*Prunus avicum*) (FRANCK et al., 2001).

Tecidos hiperhídricos podem apresentar também aumento na concentração de ferro, etileno e peróxido de hidrogênio (SAHER et al., 2004) e menores níveis de proteínas e da atividade de enzimas envolvidas na síntese de lignina (ZIV & ARIEL, 1991).

A toxicidade por ferro em plantas está associada ao excesso de água no ambiente das raízes. O ferro livre no interior das células pode interagir com o O²⁻ para formar ânions superóxidos e danificar as membranas pela degradação dos componentes lipídicos insaturados. No entanto, as células vegetais podem limitar estes danos armazenando excesso de ferro em complexos ferro-proteínas chamados de fitoferritina (BIENFAIT & VAN DER MARK, 1983). A produção de altas concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em resposta ao estresse, pode induzir a liberação de peroxidases nas membranas (GRODEN & BECK, 1979).

A hiperhidricidade afeta os níveis de clorofila (BARBOSA, 2006). Folhas hiperhídricas de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) exibiram menor conteúdo de clorofilas 'a' e 'b' em comparação com folhas normais (PICOLI et al., 2008). Estas características influenciam a capacidade fotossintética das plantas hiperhídricas e reduzem o metabolismo (FRANCK et al., 2001; JONES et al., 1993). A taxa fotossintética é também limitada pela concentração de CO₂ na atmosfera, devido sua capacidade de carboxilação da enzima rubisco quando a concentração de CO₂ é baixa, ou capacidade de regeneração da molécula aceptor de ribulose-1,5-bifosfato quando a concentração de CO₂ é alta (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Simultaneamente à perda de clorofilas 'a' e 'b' ocorreu aumento no conteúdo de poliaminas livres em brotos hiperhídricos de baunilha (*Vanilla planifolia*), indicador bioquímico de hiperhidricidade (SREEDHAR et al., 2009).

Controle da hiperhidricidade

A preocupação com o controle da hiperhidricidade deve-se, principalmente, ao fato de diferentes cultivares de uma mesma espécie reagirem diferentemente à indução dessa desordem, ou seja, há uma relação entre o genótipo cultivado e os fatores do meio de cultivo. Em damasqueiro (*Prunus armeniaca*), a cultivar 'Lorna' é mais sensível a hiperhidricidade do que a cultivar 'Helena' sob as mesmas condições de cultivo (PEREZ-TORNERO et al., 2001). Estes autores mostram que a utilização de um sistema de resfriamento de fundo reduziu a umidade relativa no ambiente, evitando a ocorrência de hiperhidricidade, mas resultou na diminuição nas taxas de proliferação, e que um aumento da intensidade luminosa diminuiu a

ocorrência de hiperhidricidade, mas produziu uma cor verde pálido nos explantes.

No que diz respeito às condições de luminosidade, de maneira geral, para a grande maioria das espécies, uma incubação inicial em presença de luz com intensidade de 20 a 70 mmol/m²/s, e com temperaturas entre 20°C e 27°C são satisfatórias para muitas plantas. O fotoperíodo mais utilizado nos laboratórios está entre 12h e 16h, e tem grande resposta morfogênica *in vitro* (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). No entanto, dependendo da espécie em questão estas condições variam.

Alta irradiância e fornecimento de ventilação reduziram os brotos suculentos em plantas de jojoba, sendo os menores valores de hiperhidricidade registrados a alta irradiância combinada com alta ventilação (MILLS et al., 2009).

Assim, as condições de ventilação entre o ambiente do frasco de cultivo e o meio externo são necessárias para evitar ou reduzir a incidência de hiperhidricidade. O uso de filme de polipropileno transparente (DAL VESCO et al., 2001), membrana porosa (FAL et al., 2002), filme de PVC (INÁCIO, 2010), papel (TSAY et al., 2006) ou tampas com um orifício coberto com poliéster ou malha de algodão (IVANOVA & STADEN, 2010) para vedar os frascos possibilita perdas de água mais rápidas para o ambiente, aumentando a taxa de transpiração dos brotos e reduzindo a incidência de hiperhidricidade. Por outro lado, utilizando tampas que impedem completamente a ventilação nos frascos para a micropropagação de plantas de batata, PARK et al. (2004) observaram sintomas severos de hiperhidricidade, sendo os níveis de etileno no interior dos frascos significativamente maiores.

Quanto às alterações do meio de cultivo para evitar ou reduzir hiperhidricidade, pode-se considerar o agente gelificante, a concentração de sais e o tipo e concentração de citocininas.

Os agentes gelificantes nos meios de cultivo proporcionam o controle osmótico sobre o explante, evitando que ocorra excesso de umidade e, conseqüentemente, a hiperhidricidade (WU, 2007).

O uso de agar hidrolisado (0.7%) Difco atua contra a hiperhidricidade quando é adicionado ao meio líquido de proliferação, sendo a fração oligossacarídeo do agar hidrolisado o componente ativo na superação da hiperhidricidade em macieira (MARGA et al., 1997). Assim, a mistura do agar com outros tipos de agentes gelificantes pode ser usada a fim de reduzir a hiperhidricidade. Uma maior concentração de agar (10,0 g L⁻¹, quantidade acima da normalmente empregada para o cultivo *in vitro* da flor mosquitinho - 7,0 g L⁻¹) utilizada no meio de cultura levou à ausência de hiperhidricidade (RADMANN et al., 2001).

Em meio isento de fitorreguladores para micropropagação de abacaxi 'Pérola' (DAL VESCO et al., 2001) e da flor mosquitinho (RADMANN et al.,

2001) ocorreu redução significativa na incidência de hiperhidricidade.

Correlacionando as concentrações de BAP e ANA com a atividade de peroxidase e o teor de proteína solúvel total, como possíveis marcadores bioquímicos de hiperhidricidade, FRÁGUAS et al. (2009), observaram que o meio de cultura mais adequado foi aquele que continha 1,0 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ ANA, proporcionando menor porcentagem de hiperhidricidade em gemas de abacaxizeiro da cultivar 'IAC Gomo-de-mel', simultaneamente à maior atividade da peroxidase em plantas com maior porcentagem de hiperhidricidade.

A hiperhidricidade em pereira, cultivares 'Hosui' e 'Kosui' é afetada pelo tipo de citocinina contida no meio de cultura, sendo que os sintéticos derivados de fenilureia (forclorfenuron - CPPU e TDZ) produzem alta frequência de brotos hiperhídricos, enquanto que adenina derivados (BA e CIN) induzem menos a hiperhidricidade (KADOTA & NIIMI, 2003). Concentrações de BAP superiores a 1,0 mg L⁻¹ promoveram hiperhidricidade em brotos de *Prunus* spp. 'Carelli' (TEIXEIRA et al., 2004) e a ausência de uma mistura de BA e ANA no meio de cultura de micropropagação de *Scrophularia yoshimurae* resulta em menor ocorrência de brotos hiperhídricos do que no meio contendo as citocininas (TSAY et al, 2006).

A adição da auxina ANA ao meio de cultura, além de aumentar a formação de calos, diminui a ocorrência de hiperhidricidade de 41,3% a 24,8% em brotos de mosquitinho (QUOIRIN et al., 2008).

Quanto à concentração de sais no meio de cultura, para a obtenção de alta taxa de multiplicação e baixa incidência de hiperhidricidade em *Aloe polyphylla*, IVANOVA & STADEN (2009) recomendam a utilização de baixa concentração do íon NH⁴⁺ (10.3 mM) no meio combinado com baixa concentração de BA (5 µM) e a utilização das razões NH₄⁺:NO₃⁻ (mM) de 20:40, 30:30 e 40:20, em vez de amônio como única fonte de nitrogênio.

A utilização de sacarose no meio de cultura tem sido testada como alternativa para controlar a hiperhidricidade. Em *Cochlospermum regium*, uma planta medicinal do cerrado, explantes outrora hiperhídricos não apresentaram essa característica quando mantidos em meio com 60 e 90 g L⁻¹ de sacarose, sendo que com 30 g L⁻¹ de sacarose, os explantes tiveram melhor desenvolvimento, porém sem controle da hiperhidricidade. Assim, foi possível averiguar uma diminuição na porcentagem e intensidade de hiperhidricidade conforme o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura (INÁCIO, 2010). Explantes de *Pinus sylvestris* L., cultivados no meio contendo sacarose produziram a mais alta frequência de regeneração (81%), em comparação com meios de glicose e frutose, bem como ausência de hiperhidricidade das brotações adventícias (SUL & KORBAN, 1998).

Uma alternativa para reduzir a ocorrência de hiperhidricidade foi proposta por WANG et al. (2007), com a adição dos elementos-traço lantânio (La^{3+}), cério (Ce^{3+}) e neodímio (Nd^{3+}) no meio de cultivo. Estes elementos incrementam as atividades enzimáticas antioxidativas nos brotos adventícios, como, por exemplo, peroxidase, catalase, superóxido dismutase, monodeidroascorbato redutase e glutatona redutase. Com isto, os autores verificaram redução da quantidade de água contida nos brotos, aumento da concentração de proteína solúvel, redução das concentrações de H_2O_2 e malondialdeído (MDA) e redução da taxa de hiperhidricidade em brotos de maca peruana (*Lepidium meyenii*) de 92% em plantas cultivadas em meio sem os elementos-traço, para 30%, 32% e 30%, em meios com La^{3+} , Ce^{3+} e Nd^{3+} respectivamente. Contudo, quando as concentrações de La^{3+} , Ce^{3+} e Nd^{3+} foram maiores do que 0,1 mM, a diferenciação foi inibida.

Geralmente o carvão ativado é utilizado em meio de cultura para auxiliar na adsorção de compostos fenólicos como função de antioxidante (INÁCIO, 2010) e conduzir à rota organogênica (TORRES et al., 1998). O carvão ativado é também apto a efetuar a retenção de concentrações excessivas de fitoreguladores e compostos tóxicos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998), podendo, desta forma, diminuir a hiperhidricidade. Na presença de carvão ativado BEVILACQUA (2009) não constatou alterações morfológicas em calos de *Calendula officinalis* L..

Aplicações da biologia molecular no controle da hiperhidricidade

A biologia molecular é um eficiente instrumento de estudo da hiperhidricidade, por meio do emprego de conhecimentos de genética, bioquímica e metabolismo vegetal relacionados com as condições ambientais.

As técnicas de biologia molecular que auxiliam no controle da hiperhidricidade incluem a utilização de marcadores de estresse em condições *in vitro*, o co-cultivo de plantas e micro-organismos e o estudo de componentes celulares indicadores de hiperhidricidade.

As proteínas são marcadores de hiperhidricidade, pois suas concentrações são menores em folhas hiperhídricas e algumas proteínas estão presentes nessa condição, mas não em condições normais (ZIV, 1991). A "Binding Protein" (BiP), uma proteína do grupo das "heat shock protein" ou proteínas de choque térmico, é utilizada para monitorar estresse intracelular em plantas, pois sua síntese é aumentada em função de diversos estresses fisiológicos.

A BiP apresenta-se em dois estados em células vegetais, fosforilada e não-fosforilada, sendo que este equilíbrio pode ser deslocado em qualquer direção em resposta a diferentes estímulos. A condição de estresse hídrico estimula a fosforilação de espécies de

BiP em células de soja e há acúmulo desta proteína, sugerindo que sua síntese pode ser regulada por fatores estressantes abióticos (CASCARDO et al., 2000).

Os estresses ambientais causam, em determinadas plantas, um aumento na síntese de proteínas e, como uma das funções da BiP é realizar o dobramento de proteínas dentro do retículo endoplasmático, o aumento da atividade secretora destas e o acúmulo de proteínas desdobradas resultam na indução da síntese de BiP nas plantas (BOSTON et al., 1996).

Aumento na indução de BiP foi detectada em plantas hiperhídricas quando comparadas às normais, sugerindo uma condição de estresse (FONTES, 1998). Assim, a síntese de BiP pode ser utilizada como um marcador para o acompanhamento de espécies em que a hiperhidricidade é um fator limitante.

A superexpressão de BiP na cultura de protoplastos de tabaco aumenta a tolerância da planta a estresse (LEBORGNE-CASTEL et al., 1999). Semelhante ao BiP, outras proteínas como a esterase, fosfatase ácida, malato desidrogenase e peroxidase podem ser utilizadas como marcadores de estresse *in vitro* (PICOLI et al., 2008).

Outra técnica da biologia molecular para reverter a hiperhidricidade é o emprego de micro-organismos no cultivo. Uma bactéria de solo do gênero *Pseudomonas*, que encontra-se associada às plantas de orégano (*Origanum vulgare*), foi inoculada em cultura de tecidos desta planta, prevenindo hiperhidricidade após 10 a 15 dias da inoculação (SHETTY et al., 1995). As raízes inoculadas com *Pseudomonas* sp. apresentaram menor conteúdo de água e maiores níveis de clorofila e fenóis que a parte aérea hiperhídrica, permitindo a aclimatização dos clones em estufa.

A redução da hiperhidricidade é parcialmente devida a um polissacarídeo extracelular de *Pseudomonas* spp., pois a taxa de redução de hiperhidricidade nos tecidos tratados com este componente foi intermediária àquelas obtidas em tecidos não inoculados e tecidos inoculados com o micro-organismo, estes últimos apresentando os menores índices de hiperhidricidade (SHETTY et al., 1996). *Pseudomonas mucidolens* também é capaz de prevenir hiperhidricidade em clones de orégano (UENO & SHETTY, 1996).

Como consequência de impedir hiperhidricidade em orégano tem-se o aumento na síntese de compostos fenólicos. Apenas as linhagens clonais que produziram altos níveis de compostos fenólicos em resposta a *Pseudomonas* spp. sobreviveram e tiveram redução de hiperhidricidade (SHETTY et al., 1996).

O estudo dos componentes celulares presentes em tecidos hiperhídricos pode elucidar as causas das respostas metabólicas destas plantas. A relação entre estruturas N-glicanas e o estado morfofisiológico de

tecidos de cactos (*Mammillaria gracillis*), mostra que sete estruturas são comuns em tecidos hiperhídrico e tumoral, sugerindo que o nível de organização dos tecidos vegetais está relacionado com o padrão de N-glicosilação de proteína. Isso mostra que a perda progressiva e irreversível da totipotência organogênica no curso de progressão de tumores hormônio-independente e teratomas hiperhídricos caracterizam tumores em plantas (BALEN et al., 2006).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hiperhidricidade merece atenção em estudos que visem esclarecer as alterações morfofisiológicas das plantas e descobrir meios de controle deste quadro. Alterações fisiológicas em plantas hiperhídricas, tais como mudanças nas concentrações de enzimas, níveis de proteínas e fitorreguladores, além de alterações morfológicas, causam danos ao metabolismo vegetal e reduzem o tempo de sobrevivência da planta.

O controle da hiperhidricidade tem sido aprimorado por meio de ajustes das condições internas e externas do meio de cultivo. Estudos em biologia molecular são úteis na descoberta de consequências morfofisiológicas e de novas e eficientes alternativas de controle da hiperhidricidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R.B.N.; BERTONI, B.W.; VIEIRA, R.F.; et al. Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (*Amaranthaceae*) para conservação *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 4, p. 510-515, 2010.
- ANDRADE, S.R.M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Planaltina: Embrapa, 2002. 14p. Documento 58. Disponível em: <http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/versaomodelo/html/2002/doc/doc_58.shtml> Acesso em: 27 mai. 2009.
- ANGRA, D.C.; BARBOSA, M.M.; PRESTES, A.M. et al. Cultivo de embriões em retrocruzamentos entre *Triticum aestivum* Thell. e *Agropyron elongatum* Host. & Beauv. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 209-215. 1999.
- BALEN, B.; KRSNIK-RASOL, M.; ZAMFIR, A.D. et al. Glycoproteomic Survey of *Mammillaria gracillis* Tissues Grown *in Vitro*. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 5, n. 7, p. 1658–1666, 2006.
- BARBOSA, L.M.P. **Caracterização anatômica e bioquímica da hiperhidricidade em morangueiro (*Fragaria x ananassia* Duch) e videira (*Vitis vinifera*) propagados *in vitro***. 2006. 146p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa.
- BASKARAN, P.; JAYABALAN, N. An improved protocol for adventitious shoot regeneration and plant formation in *Psoralea corylifolia* L. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 123, p. 283–286, 2009.
- BERTONI, B.W.; DAMIÃO FILHO, C.F.; MORO, J.R.; et al. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 48-54, 2006.
- BEVILACQUA, C.B. 2009. 78f. **Germinação e cultivo *in vitro* de *Calendula officinalis* L.** Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Santa Maria, RS.
- BIENFAIT, H.E; VAN DER MARK, E. Phytoferritin and its role in iron metabolism. **Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, Londres, n. 21, p. 111–123, 1983.
- BOSTON, R.S.; VIITANEN, P.V.; VIERLING, E. Molecular chaperones and protein folding in *plants*. **Plant Molecular Biology Journal**, Zurich, v. 34, p. 191–222, 1996.
- BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F.; et al. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.
- CARVALHO, D.C.; FILHO, F.A.A.M.; MENDES, B.M.J.; et al. Regeneração de plantas após fusão de protoplastos de tangelo 'Page' e toranja 'Lau Tau' **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 329-332, 2007.
- CASCARDO, J.C.M.; ALMEIDA, R.S.; BUZELI, R.A.A.; et al The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v. 275, n. 19, p. 14494-14500, 2000.
- CHANG, C.J.; KAO, C.H. H₂O₂ metabolism during senescence of rice leaves: changes in enzyme activities in light and darkness. **Journal of Plant Growth Regulators**, New York, v. 25, n. 1, p. 11- 15, 1998.
- COSTA, A.S.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BLANK, A.F.; et al. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Revista Horticultura Brasileira**, Jaboticabal, v.25, n.1, p. 68-72, 2007.

- DAL VESCO, L.L.; PINTO, A.A.; ZAFFARI, G.R; et al. Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. **Fruits**, Montpellier, v. 56, p. 143–154, 2001.
- DANTAS, A.C.M.; NUNES, J.C.N.; MORAES, L.K.A. Resgate de embriões imaturos *in vitro* de porta-enxertos de macieira (*Malus* spp.) **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 246-249, 2001.
- DEBERGH, P.; HARBAOUI, Y.; LEMEUR, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. **Physiologia Plantarum**, Lund, n. 53, p. 181-187, 1981.
- DEBERGH, P.; AITKEN-CHRISTIE, J.; COHEN, D. et al. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. **Plant Cell Tissue Organ and Culture**, Dordrecht, v. 30, p. 135–140, 1992.
- FAL, M. A.; MAJADA, J. P.; SÁNCHEZ TAMÉS, R. Physical environment in non-ventilated culture vessels affects *in vitro* growth and morphogenesis of several cultivars of *Dianthus caryophyllus* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Gaithersburg, v. 38, p. 589–594, 2002.
- FERREIRA, M.A.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. **Aplicações da cultura de tecidos vegetais no melhoramento genético de plantas**. 1998.
- FIGUEIREDO, M.A.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, A.G. et al. Fontes de potássio no crescimento *in vitro* de plantas de orquídea *Cattleya loddigesii*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 255-257, 2008.
- FONTES, M.A. **Morfogênese *in vitro*, isolamento e cultivo de protoplastos e transformação genética de pimentão (*Capsicum* sp.)**. 1998. 167p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa.
- FONTES, M.A. OTONI, W.C.; CAROLINO, S.M.B.; et al. Hyperhydricity in pepper plants regenerated *in vitro*: involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. **Plant Cell Reports**, New York, n. 19, p. 81-87, 1999.
- FRÁGUAS, C.B. **Análises bioquímicas e histológicas na micropropagação de Abacaxizeiro 'gomo de mel' submetido a reguladores vegetais**. 2006. 110 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu.
- FRÁGUAS, C.B.; DORNELLES, C. M. DA V.; LIMA, G. P. P. Benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na indução e multiplicação *in vitro* de gemas de abacaxizeiro da cultivar 'IAC Gomo-de-mel'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p. 1682-1687, 2009.
- FRANCK, T.; GASPAR, T.; KEVERS, C. et al. Are hyperhydric shoots of *Prunus avium* L. energy deficient? **Plant Science**, Limerick, v. 160, n. 6, p. 1145–1151, 2001.
- FRANCK, T.; KEVERS, C.; DEBY-DUPONT, G.; et al. Hyperhydricity: a special defense strategy against *in vitro* culture stress conditions? **Archives of Physiology and Biochemistry**, Lisse, v. 106, n. 1, p. 71, 1998.
- GASPER, T.; HAGÈGE, D.; KEVERS, C. et al. When plant teratomas turn into cancers in the absence of pathogens. **Physiologia Plantarum**, Lund, v.83, n.4, p.96-701, 1991.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture. The technology**. 2 ed. England: Exegetics, 1993. 575p. v.1.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: Torres, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, A. (Org.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1 ed. Brasília: Embrapa- SPI, 1998, v.1.
- GRODEN, D.; BECK, E. H₂O₂ destruction by ascorbate-dependent systems from chloroplasts. **Biochemistry Biophysics Acta - Bioenergetics**, Amsterdam, v. 546, p. 426-435, 1979.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Apostila de Biotecnologia - Cultura de tecidos vegetais**. Universidade Federal de São Carlos. Florianópolis: Steinmacher, 2006. 41p. Disponível em: http://www.ufsm.br/petagonomia/apostilas/biotecnologia_ufsc.pdf Acesso em: 27 mai. 2009.
- HAN, B.H.; JOUNG, H.Y; CHOI, J.K.; et al. Effects of sealing materials and relative humidity of culture vessels on growth, vitrification and nutrient contents in *in vitro* plantlets of *Gypsophila paniculata* Bristol Fairy. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, Suwon, v. 36, p. 886-892, 1996.
- HAN, B.H.; PAEK, K.Y.; CHOI, J.K. Micropropagation of *Gypsophila paniculata* through shooty tip culture *in vitro*. **Journal of Korean Society for Horticultural Science**, Suwon, v. 32, n. 3, p. 394-400, 1991a.
- HAN, B.H.; PAEK, K.Y.; CHOI, J.K. Prevention of vitrification of *Gypsophila paniculata* regenerated *in vitro*.

vitro. **Journal of Korean Society for Horticultural Science**, Suwon, v. 32, n. 4, p. 518-524, 1991b.

INÁCIO, M.C. **Estudo agrônômico, químico e biológico de *Cochlospermum regium* (Mart. ex. Scharank): uma planta medicinal do cerrado**. 2010. 132 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, SP.

IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 104, p. 13–21, 2011.

IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schonland ex Pillans. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 60, p. 143–15, 2010.

IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Nitrogen source, concentration, and $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, p. 167–174, 2009.

IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of *in vitro* regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, p. 227–231, 2008.

JONES, N.B.; DRENNAN, P.M.; VAN STADEN, J. Leaf anatomy, chloroplast organization and photosynthetic rate of hyperhydric *Eucalyptus saligna* Sm. **South African Journal of Botany**, Pietermaritzburg, v. 59, p. 551–555, 1993.

KADOTA, M.; NIIMI, Y. Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 72, p. 261–265, 2003.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biociência**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33, 1997.

KEVERS, C.; COUMANS, M.; COUMANS-GILLÉS, F.; GASPAR, T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 61, p. 69-74, 1984.

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R.; et al. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cellular Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77,

p. 181-191, 2004.

LATADO, R.R.; DERBYSHIRE, M.T.V.C.; TSAI, S.M. et al. Obtenção de híbridos somáticos de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 12, p. 1745-1741, 2002.

LEBORGNE-CASTEL, N.; JELITTO-VAN DOORE, E.P.W.M.; CORFTS, A. et al. Overexpression of BiP in Tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, p. 459-470, 1999.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 271-276, 1988.

MAJADA, J.P.; FAL, M.A.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. The effect of ventilation rate on proliferation and hyperhydricity of *Dianthus caryophyllus* L. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Gaithersburg, v.33, p.62-69, 1997.

MILLS, D.; YANQING, Z.; BENZIONI, A. Effect of substrate, medium composition, irradiance and ventilation on jojoba plantlets at the rooting stage of micropropagation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.121, p. 113–118, 2009.

MITTAL R.; DUBEY, R. Behavior of peroxidases in rice: changes in enzyme activity and isoforms in relation to salt tolerance. **Plant Physiology Biochemistry**, Paris, v. 29, p. 31-40, 1991.

OLIVEIRA, J.E.Z. de; AMARAL, C. L. F.; CASALI, V.W.D. Caracterização isozimática e atividade de peroxidase em folhas de plantas hiperhídricas, intermediária e normal de *Bidens pilosa* L. mantidas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 32-36, 2008.

OLMOS, E.; HELLÍN, E. Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 75, p. 91-101, 1998.

PARK, S.W.; JEON, H.H.; KIM, H.S. et al. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, p. 199-205, 2004.

PEREZ-TORNERO, O.; EGEE, J.; OLMOS, E.; BURGOS, L. Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Gaithersburg, v. 37, p. 250-254, 2001.

PICOLI, E.A.T.; OTONI, W.C.; FIGUEIRA, M.L. et al. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP

- (Binding Protein). **Plant Science**, Limerick, v. 160, p. 857–868, 2001.
- PICOLI, E.A.T.; PAIVA, E.A.S.; XAVIER, A. et al. Ultrastructural and biochemical aspects of normal and hyperhydric eucalypt. **International Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 14, n. 3, p. 61–69, 2008.
- PIZA, I.M.T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 4, p. 361-366, 2003.
- QUOIRIN, M.G.G.; BIASI, L.A.; RIOS, J.F. et al. Micropropagação de *Gypsophila* pela cultura de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 79-83, 2008.
- RADMANN, E.B.; BRAGA, E.J.B.; KARAN, M.A.L.; et al. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 3, p. 171-175, 2001.
- RADMANN, E.B.; BIANCHI, V.J.; SOUZA, T.M.; et al. Influência da composição do meio de cultivo e do tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp. 'GXN-9'. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 095-101, 2009.
- REUTHER, G. Stimulation of the photoautotrophy of *in vitro* plants. In: RADMANN, E.B.; BRAGA, E. J.B.; KARAN, M.A.L.; POSADA, M.A.C.; PETERS, J.A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 3, p. 171-175, 2001.
- RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; et al. Micropropagação de *aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 517-524, 2005.
- SAEBO, A.; KREKLING, I.T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 41, n. 2, p. 177-185, 1995.
- SAHER, S.; PIQUERAS, A.; HELLIN, E. et al. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 120, n. 1, p. 152-161, 2004.
- SCHMILDT, O.; SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T. do. Sulfato de adenina na multiplicação *in vitro* de polysaccharide-producing soil bacteria on mamoeiro 'tainung 01'. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.8, n.2, p.141-147, 2007.
- SHETTY, K.; CARPENTEF, T.L.; CURTIS, O.F.; et al. Reduction of hyperhydricity in tissue cultures of oregano (*Origanum vulgare*) by extracellular polysaccharide isolated from *Pseudomonas* spp. **Plant Science**, Limerick, v. 120, p. 175-183, 1996.
- SHETTY, K.; CURTIS, O.F.; LEVIN, R.E.; et al. Prevention of vitrification associated with *in vitro* shoot culture of oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* sp. **Journal of Plant Physiology**, v.147, p.447–451, 1995.
- SIMÕES, M.O.M. **Ontogênese de gemas e raízes adventícias de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv Pêra cultivadas *in vitro***. 1988. 56p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa.
- SUL, I.; KORBAN, S. S. Effects of media, carbon sources and cytokinins on shoot organogenesis in the Christmas tree Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 73, n. 6, p. 822-827, 1998.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
- TEIXEIRA, P.D.E.T.; SILVA, A.L.da; DUCROQUET, J.P.H.J. et al. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* spp. 'Carelli'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n.2, p. 377-379, 2004.
- TORRES, A.C. et al. **Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa. 1998. p. 87-132.
- TORRES, A.C. et al. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa, 2000. 128p. In: ANDRADE, S.R.M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Planaltina: Embrapa, 2002. 14p. Documento 58. Disponível em: http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/2002/doc/doc_58.pdf Acesso em: 27 mai. 2009.
- TSAY, H-S.; LEE, C-Y.; AGRAWAL, D.C.; et al. Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* – a medicinal plant. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Gaithersburg, v.42, p. 445–449, 2006.
- UENO, K-I; SHETTY, K. Effect of selected hyperhydricity control in oregano tissue cultures.

Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 63, n. 2, p. 767–770, 1997.

WANG, Y.L.; WANG, X.D.; ZHAO, B. et al. Reduction of hyperhydricity in the culture of *Lepidium meyenii* shoots by the addition of rare earth elements. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 52, n. 2, p. 151–159, 2007.

WU, C.K. **Formação de Mudas e Microtubérculos de Batata (*Solanum tuberosum* L.) em Sistemas Biorreatores**. 2007. 95 f. Dissertação (Mestre) - Curso de Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico, Campinas, 2007.

VILLA F.; PASQUAL, M.; FRÁGUAS, C.B.; et al. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de

videira 'VR043-43': efeito do ANA e NaCl. **Agrarian**, Dourados, v. 1, n. 2, p. 103-111, 2008 a.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L.A.S.; et al. Cloreto de potássio e fosfato de sódio na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cv. Tupy. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 37-41, 2008 b.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds.), **Micropropagation: Technology and Application**, Kluwer Academic Press, Dordrecht, p. 45-69, 1991.

ZIV, M.; ARIEL, T. On the relation between vitrification in stomatal cell wall deformity in carnation leaves *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 314, p. 121-129, 1991.