

KATRYNE RATES GOULART FERNANDES

**INFLUÊNCIA DE 6-BENZILAMINOPURINA NA
MORFOGÊNESE *in vitro* E NA OCORRÊNCIA DE
HIPERIDRICIDADE NO PORTA-ENXERTO ‘VR 043-43’ (*Vitis
vinifera* x *Vitis rotundifolia*)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

KATRYNE RATES GOULART FERNANDES

**INFLUÊNCIA DE BAP NA MORFOGÊNESE *in vitro*, TROCAS
GASOSAS, ABSORÇÃO DE NUTRIENTES E
HIPERIDRICIDADE NO PORTA-ENXERTO VR 043-43 (*Vitis
vinifera* x *Vitis rotundifolia*)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia Vegetal, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de março de 2009.

Prof^a Luzimar Campos da Silva
(Co-orientadora)

Dr. Franciscléudo Bezerra da Costa

Dr. Dimas Mendes Ribeiro

Dr. Reginaldo A. Festucci-Buselli

Prof. Wagner Campos Otoni
(Orientador)

*Aos meus pais, Pedro Rates Fernandes e
Ires Goullart Fernandes, ofereço e dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas inúmeras oportunidades e por sua infinita misericórdia e amor.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Wagner Campos Otoni, pela orientação, apoio, paciência e respeito em todas as circunstâncias.

Aos professores Raimundo Santos Barros, Fernando Luiz Finger, Nilda de Fátima Ferreira Soares e José Cambraia pela disponibilidade dos laboratórios, equipamentos e reagentes para a realização das análises.

À professora Luzimar Campos da Silva, pelas orientações, conselhos e apoio.

Ao Elcio, Dimas, Diego, Donizette, André, Renato, Ana Maria, Caroline Müller, Clarice, Joyce, Elaine Cabrini, Mateus e Éber, pelos ensinamentos e auxílio durante as análises.

Aos colegas de laboratório Fabiana, Maurecilne, Elisa, Maria Luiza (Malú), Lívia, Thiago, Daniela, Crislene, Ana Cláudia, Sebastião Vasconcelos, Reginaldo Buselli, Joseila, Iulla, Cléber, Leandro, Elyabe e Virgílio, pelo convívio, ensinamentos e auxílio.

Aos colegas Letícia Barbosa, Roniscley Santos e Leonardo Dias, pelos esclarecimentos, auxílio e presteza.

Ao Paulo César Cavatti, pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos técnicos Carlos Fonseca, Oswaldo, Reginaldo, Edite, Bhering, Toninho, Carlos Raimundo, Beto (Fertilidade dos Solos), Carlinhos, José Maria e Elisonete (Lili), pelo auxílio, ensinamentos e presteza nas horas mais necessárias.

Aos funcionários da Universidade Federal de Viçosa e do BIOAGRO, pelo trabalho e dedicação.

Aos demais professores e alunos da Fisiologia Vegetal e do laboratório de Anatomia Vegetal, por todas as lições profissionais e humanas ao longo do curso.

Aos secretários Beth, Cássia e Ângelo, pela paciência, auxílio e esclarecimentos prestados.

Aos amigos Eduardo Gusmão, Élcio, Ronivon, Marcos, Ana Ermelinda, Werner, Silvano, Renato, Marcos Vinícius, Denise Fernandes, Thales, Marcelo Rodrigues e Rogério Della-Riga, pela ajuda, carinho e por todos os momentos compartilhados.

Aos amigos Roziley Alves Gomes, Alaíde Maria Estaglianon e Murilo Rodrigues, pelo apoio, incentivo e carinho.

A Antônio de Pádua (Paty) pela paciência e auxílio na confecção das tampas. À Elayna Maciel, pelo breve, porém valioso convívio, e à Cristina Custódio, por todo o apoio, ajuda, amizade e carinho.

À Ana Claudia Ferreira da Cruz e à Lourdes Iarema, pelos inúmeros ensinamentos, ajuda e aconselhamento profissional, por compartilharem parte de suas vidas e pelo incansável apoio e cuidado despendidos. Agradeço especialmente pela ajuda com a parte anatômica do trabalho.

À Kelly Juliane Telles Nascimento, companheira e amiga de todas as horas e circunstâncias, por toda ajuda, incentivo, conversas e apoio incondicional.

Ao padrinho José Carlos de Souza, por todo amor, carinho, apoio e dedicação.

A José Alves Neto, pelo amor, apoio, conselhos, cuidado, respeito e paciência incondicionais pelo tempo em que estivemos juntos. Agradeço ainda à sua família, especialmente a Roserlei, Ruth e D. Maria Almeida Alves, pelo convívio, respeito e carinho.

Ao meu irmão Ricardo e à minha família, pelo amor, carinho, auxílio, incentivo e conselhos.

Aos meus pais, Ires e Pedro, por todo o amor, sacrifício, dedicação, compreensão, apoio e carinho em todos os momentos da minha vida.

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Katryne Rates Goulart Fernandes, filha de Pedro Rates Fernandes e Ires Goulart Fernandes, nasceu no dia 27 de maio de 1983 em Rio Verde, Goiás.

Em 2005 concluiu o curso de Licenciatura Plena em Ciências, Habilitação em Biologia, pela Universidade de Rio Verde – FESURV.

Em 2006 ingressou no curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 31 de março de 2009.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO I - INFLUÊNCIA DO BAP NA ABSORÇÃO DE NUTRIENTES E TROCAS GASOSAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO <i>in vitro</i> DO PORTA-ENXERTO ‘VR 043-43’ (<i>Vitis vinifera</i> x <i>V. rotundifolia</i>)	6
2.1. Cultivo do material vegetal em meio indutor de calogênese	9
2.2. Cromatografia gasosa	9
2.3. Digestão nitroperclórica do material vegetal	10
2.4. Delineamento experimental	10
3. RESULTADOS	11
3.1. Crescimento e desenvolvimento	11
3.2. Teores de macro e micronutrientes da parte aérea	16
3.3. Níveis de CO ₂ e O ₂ acumulados na atmosfera interna	18
4. DISCUSSÃO	21
4.1. Crescimento e desenvolvimento	21
4.2. Teores de macro e micronutrientes da parte aérea	23
4.3. Níveis de CO ₂ e O ₂ acumulados na atmosfera interna	24
5. CONCLUSÕES	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO II - HIPERIDRICIDADE NO PORTA-ENXERTO ‘VR 043-43’ (<i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis rotundifolia</i>) INDUZIDA PELO BAP	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1. Cultivo do material vegetal em meio indutor de hiperidricidade	33
2.2. Análise estrutural	33
2.3. Digestão nitroperclórica do material vegetal	34
2.4. Delineamento experimental	34
3. RESULTADOS	35
3.1. Crescimento e desenvolvimento	35
3.2. Análise estrutural	39
3.2.1. Estudo anatômico	39
3.2.2. Histoquímica	40
3.3. Teores de macro e micronutrientes da parte aérea	42
4. DISCUSSÃO	45
4.1. Crescimento e desenvolvimento	45
4.2. Análise estrutural	46
4.2.1. Estudo anatômico	46
4.2.2. Histoquímica	47
4.3. Teores de macro e micronutrientes da parte aérea	49
5. CONCLUSÕES	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
CONCLUSÕES GERAIS	55

RESUMO

FERNANDES, Katryne Rates Goulart, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2009. **Influência de 6-benzilaminopurina na morfogênese *in vitro* e na ocorrência de hiperidricidade no porta-enxerto ‘VR043-43’ (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*)**. Orientador: Wagner Campos Otoni. Co-orientadores: Carlos Alberto Martinez y Huaman e Luzimar Campos da Silva.

A utilização de citocininas no cultivo *in vitro* de plantas pode induzir, em variadas concentrações, a ocorrência de alterações estruturais e morfológicas, comprometendo o desenvolvimento e viabilidade do material obtido. Este trabalho objetivou caracterizar a influência da 6-benzilaminopurina (BAP) na morfogênese e nutrição do porta-enxerto de videira VR043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). Utilizou-se plantas obtidas a partir do cultivo de segmentos nodais em meio indutor de hiperidricidade e em meio indutor de calogênese, suplementados com BAP, e em meio sem regulador. Em meio indutor de calogênese foram mensurados a massa fresca e seca das plantas, os teores de macro e micronutrientes e os níveis de oxigênio e dióxido de carbono na atmosfera dos frascos aos 15, 30 e 45 dias. Em meio indutor de hiperidricidade determinou-se os teores de macro e micronutrientes aos 45 dias de cultivo, além da análise estrutural das folhas obtidas. Os resultados demonstraram que o BAP comprometeu a organogênese, promovendo calogênese e inibindo a rizogênese, o alongamento dos entrenós e a expansão foliar. Além disso, o BAP alterou a relação da massa fresca e seca da parte aérea/sistema radicular em detrimento dos ramos; alterou a nutrição da parte aérea das plantas, induzindo a formação de calos, os quais representaram uma barreira mecânica à absorção dos elementos do meio de cultivo. Houve maior acúmulo de CO₂ e consumo de O₂ na atmosfera dos frascos com citocinina, em meio indutor de calogênese, refletindo a elevada taxa respiratória dos calos, o que comprometeu o crescimento e o desenvolvimento. Em meio indutor de hiperidricidade, o BAP promoveu alterações na morfologia das plantas de videira, como múltiplas brotações, espessamento da lâmina foliar e calejamento na base dos explantes; e alterações estruturais, como

desorganização das células parenquimáticas no mesofilo e estômatos dispostos acima das demais células da epiderme. As folhas desenvolvidas em meio contendo BAP não acumularam amido em relação ao controle, no entanto houve maior lignificação nos feixes vasculares e maior acúmulo de compostos de coloração esverdeada em reação com azul de toluidina, concomitante ao aumento na concentração desta citocinina. Conclui-se que o BAP promoveu alterações na morfogênese e no desenvolvimento das plantas. Os calos formados em meio com BAP promoveram alteração da absorção e translocação de nutrientes para a parte aérea das plantas, bem como alteração das taxas respiratórias. Houve indução de hiperhidricidade pelo BAP, evidenciada por alterações morfológicas, e alteração estrutural das folhas e da forma e disposição das células-guarda.

ABSTRACT

FERNANDES, Katryne Rates Goulart, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2009. **Influence of 6-benzylaminopurine on *in vitro* morphogenesis and hyperhydricity occurrence in 'VR043-43' (*Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*) rootstock.** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-Advisers: Carlos Alberto Martinez y Huaman and Luzimar Campos da Silva.

The use of cytokinins in variable concentrations in *in vitro* plant tissue culture can induce the occurrence of structural and morphological changes, affecting the development and viability of the obtained material. The objective of this work was to characterize the influence of 6-benzylaminopurine (BAP) upon morphogenesis and mineral nutrition of grape rootstock VR043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). Plants obtained from nodal segments in hyperhydricity and callogenesis media, supplemented with BAP and without regulator were used. In callogenesis induction medium plants fresh and dry weight, macro and micronutrients contents, oxygen and carbon dioxide levels in the headspace were measured at 15, 30 and 45 days. In hyperhydricity induction medium, the levels of macro and micronutrients and structural analysis of the leaves obtained at 45 days. The results demonstrated that BAP organogenesis, promoting callogenesis and inhibited rhizogenesis, internodal elongation and leaf expansion. BAP also altered the relation of fresh and dry mass of shoot/ root system in detriment to shoots; altered the nutrition of the shoots, inducing callus formation, which acted as a mechanical barrier to elements absorption from the medium. There was higher accumulation of CO₂ and consumption of O₂ in callogenesis induction medium, in flasks with cytokinin, reflecting the elevated respiratory rate of the calluses, which prejudiced growth and development. In hyperhydricity induction medium, BAP promoted alterations in grape plants morphology, as multiple shoots, leaf lamina thickness and callusing in the base of the explants; and structural alterations, such as disorganization of the mesophyll parenchyma cells and stomata differentiated above the other epidermic cells. Leaves developed in medium with BAP did not accumulated starch, however their vascular

bundles were most lignified and there was higher accumulation of green coloration compounds in reaction with toluidine blue concomitant with increasing of cytokinin concentration. We conclude that BAP promoted alterations in morphogenesis and development of the plants. The calluses formed in BAP-containing medium promoted alterations in nutrients absorption and translocation to shoots, as also in respiratory rates. There was hyperhydricity induction by BAP, which was evidenced by morphologic changes and structural alterations in leaves and in guard-cells shape and disposition.

INTRODUÇÃO GERAL

A videira pertence ao gênero *Vitis*, família Vitaceae, onde estão incluídas todas as variedades européias, americanas e asiáticas, sendo a espécie de maior importância a *Vitis vinifera*, pela qualidade de seus vinhos (Cataluña, 1991).

A intensificação do cultivo de videira, associado ao plantio de variedades suscetíveis, têm propiciado o surgimento de problemas fitossanitários, afetando diretamente a produção e a produtividade (Tavares & Menezes, 1991). A utilização do porta-enxerto VR043-43, resistente à fusariose e tolerante à margarode (Borghesan et al., 2003), é uma importante alternativa na obtenção de plantas saudáveis.

A propagação do híbrido VR043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) por meio de estacas lenhosas é difícil, inferior a 24%, justificando a utilização de técnicas de propagação *in vitro* como uma importante alternativa para multiplicação e obtenção em larga escala de material vegetativo de boa qualidade fitossanitária (Botelho et al, 2005; Machado, 2006), proporcionando a rápida formação do vinhedo (Dzazio et al., 2002).

A propagação *in vitro* é utilizada para rápida multiplicação de inúmeras espécies vegetais, porém o sucesso desta prática depende da capacidade das plantas obtidas resistirem à aclimatização (Hazarika, 2006). Contudo, a aplicação comercial ainda é limitada, devido ao alto custo de produção e às baixas taxas de crescimento e de sobrevivência durante o período de aclimatização (Zobayed et al., 1999). O objetivo dessa técnica é a produção massal de plantas geneticamente idênticas, fisiologicamente uniformes, morfológicamente normais e livres de patógenos, as quais possam ser aclimatizadas em reduzido período de tempo a baixo custo (Kozai et al., 1997).

Durante o subcultivo os explantes são submetidos, sucessiva ou simultaneamente, a condições ambientais e de cultivo atípicas, entre elas: perturbações mecânicas, injúrias, ferimentos e possível embolismo, resultantes da repicagem; alta osmolaridade (alto conteúdo de sacarose no meio); choque osmótico pela infiltração de meio de cultura nos espaços intercelulares; nutrição mineral

anormal (altas concentrações de amônio); tratamento hormonal atípico (altas concentrações de citocinina e/ou auxina); alta umidade relativa e possível acúmulo de gases (etileno) na atmosfera, além da isenção do material de microrganismos endógenos pelo processo de desinfestação (Gaspar et al., 2000; Kevers et al., 2004).

As condições ambientais exercem também diferentes efeitos sobre a absorção das culturas *in vitro*. A taxa de absorção de um íon pode exceder sua utilização, criando um suprimento disponível dentro do vegetal, superior ao requerido, o qual pode variar entre os tipos e estádios do crescimento (Nguyen & Kozai, 1998). Inicialmente a composição do meio e a concentração dos reguladores de crescimento são manipuladas para otimizar a relação entre o meio de cultivo e o explante. Tal medida estimula a busca pela identificação, exploração de fatores alternativos e hipóteses sobre o controle do desenvolvimento *in vitro* (Ramage & Williams, 2002).

A vedação dos recipientes utilizados na cultura de tecidos, visando evitar a contaminação, pode causar crescimento anormal devido ao acúmulo de gases como etileno nos frascos de cultivo. O etileno é um regulador de crescimento produzido por tecidos, calos e plantas, que influencia a morfogênese *in vitro* e induz a degradação da clorofila, levando à senescência e à abscisão foliar. O acúmulo excessivo deste regulador, em estádios tardios do cultivo *in vitro*, pode ser um dos principais fatores que induzem a hiperidricidade (Hazarika, 2006).

O tipo de citocinina também influencia a resposta morfogênica, sendo fundamental na indução de hiperidricidade em *Pyrus pyrifolia* (Dakota & Niimi, 2003). Níveis elevados, por sua vez, podem induzir a formação de ramos anormais, como verificado em tabaco (Ramage & Williams, 2004).

A hiperidricidade apresenta características morfológicas típicas, tais como: ramos espessos, com entrenós curtos, com aparência túrgida, hipolignificados, contendo água nos espaços intercelulares e sobre sua superfície; as folhas são malformadas, com alterações na filotaxia, frequentemente alongadas, esfaceláveis e encarquilhadas ou curvadas; múltiplas brotações evidenciando mau funcionamento dos meristemas primários, que podem degenerar rapidamente por necrose simultânea dos ápices meristemáticos (Gaspar et al., 2000).

O tipo de vedação influencia o ambiente interno dos frascos e possibilita o acúmulo de etileno, e, conseqüentemente, o desenvolvimento de hiperidricidade no porta-enxerto 'VR043-43' (Barbosa, 2006). Este porta-enxerto de videira figura entre os de maior interesse econômico no estado de Santa Catarina, dada sua resistência à

fusariose e tolerância à margarodes (Borghesan et al, 2003). Contudo, a propagação vegetativa do porta-enxerto ‘VR043-43’ pelo enraizamento de estacas lenhosas é inviável, dada a dificuldade de enraizamento (Botelho et al, 2005). Desta forma, a propagação *in vitro* torna-se uma alternativa interessante para a multiplicação deste material.

Inicialmente a composição e a relação dos reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* são manipuladas para otimização da organogênese, estimulando a busca pela identificação e exploração de fatores alternativos e hipóteses sobre o controle do desenvolvimento *in vitro* (Ramage & Williams, 2002). Contudo, durante a otimização do balanço das concentrações dos reguladores utilizados, observa-se anormalidades ou alterações no desenvolvimento dos órgãos (Ramage & Williams, 2004).

Anormalidades anatômicas e ultra-estruturais, alterações metabólicas, brotações múltiplas, albinismo e hiperidricidade são frequentemente descritos em cultura de tecidos vegetais, e geralmente atribuídos à utilização de citocinina em níveis excessivos. A elucidação dos processos fisiológicos envolvidos nestas anormalidades é difícil, dada a grande abrangência dos efeitos desencadeados pelas citocininas (Ramage & Williams, 2004).

Durante a fase de multiplicação *in vitro* de ‘VR043-43’, a utilização de BAP promove aumento no número de brotações, porém com redução da altura, formação de calos, inibição do enraizamento e sintomas de hiperidricidade (Machado et al, 2006).

Visando aperfeiçoar o processo de propagação *in vitro*, este trabalho objetivou analisar a influência da citocinina 6-benzilaminopurina na morfogênese e na ocorrência de hiperidricidade no porta-enxerto ‘VR 043-43’ (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, L. M. P. *Caracterização anatômica e bioquímica da hiperidricidade em morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) e videira (*Vitis vinifera x Vitis rotundifolia*) propagados in vitro*. Viçosa: UFV, 2006. 128 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

BORGHEZAN, M.; MORAES, L. K. A. DE; FLÁVIA MAIA MOREIRA, F. M.; SILVA, A. L. DA. Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38:783-789, 2003.

BOTELHO, R. V.; MAIA, A. J.; PIRES, E. J. P.; TERRA, M. M.; SCHUCK, E. Efeitos de reguladores vegetais na propagação vegetativa do porta-enxerto de videira VR043-43 (*Vitis vinifera x Vitis rotundifolia*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 27:6-8, 2005.

CATALUÑA, E. *As uvas e os vinhos*. 3. ed. São Paulo: Globo, 1991. 215 p.

DZAZIO, P. M.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-A'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24:759-764, 2002.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; BISBIS, B.; FRANCK, T. Special Symposium: *in vitro* plant recalcitrance loss of plant organogenic totipotency in the course of *in vitro* neoplastic progression. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 36:171–181, 2000.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108:105-120, 2006.

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*, 72:261–265, 2003.

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77:181-191, 2004.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51:49-56, 1997.

MACHADO, M. P. *Micropropagação do porta-enxerto de videira 'VR043-43' (Vitis vinifera L. x Vitis rotundifolia Michx.)*. Curitiba: UFPR, 83 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, 2006.

NGUYEN, Q.T.; KOZAI, T. Environmental Effects on the Growth of Plantlets in Micropropagation. *Environment Control in Biology*, 36:59-75, 1998.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 38:116-124, 2002.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Cytokinin-induced abnormal shoot organogenesis is associated with elevated Knotted1-type homeobox gene expression in tobacco. *Plant Cell Reports*, 22:919–924, 2004.

TAVARES, S.C.C. de H.; MENEZES, M. Processo de infecção de *Botryodiplodia theobromae* em plantas de mangueira e videira no trópico semi-árido brasileiro. *Fitopatologia Brasileira*, 16:55, 1991.

ZOBAYED, S. M. A.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Development of a forced ventilation micropropagation system for large-scale photoautotrophic culture and its utilization in sweet potato. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 35:350-355, 1999.

CAPÍTULO I

**INFLUÊNCIA DO BAP NA ABSORÇÃO DE NUTRIENTES E
TROCAS GASOSAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO *in vitro*
DO PORTA-ENXERTO ‘VR 043-43’ (*Vitis vinifera* x *V.*
rotundifolia)**

1. INTRODUÇÃO

A propagação *in vitro* de plantas possui diversas vantagens sobre a propagação vegetativa convencional, sendo aplicada mundialmente à horticultura, agricultura e silvicultura. Contudo, a utilização comercial ainda é limitada principalmente pelo alto custo de produção, baixa taxa de crescimento e de sobrevivência durante a aclimatização (Kozai et al., 1997).

Para melhorar ou otimizar as taxas de multiplicação das culturas *in vitro* em diversas espécies, tem sido prática comum a suplementação de meios de cultivo com citocininas. Além de induzir a divisão celular, as citocininas atuam em conjunto com outros fitormônios na regulação de inúmeros aspectos do desenvolvimento e fisiologia vegetais, incluindo germinação, diferenciação de cloroplastos, formação e atividade de meristemas apicais, mobilização de nutrientes, formação de novos ramos, quebra da dominância apical, expansão foliar, desenvolvimento reprodutivo, senescência e desenvolvimento do metabolismo autotrófico (Brzobohatý et al., 1994; Haberer & Kieber, 2002; Taiz & Zeiger, 2006).

As taxas de crescimento e desenvolvimento de plantas cultivadas *in vitro* são geneticamente determinadas, embora sejam limitadas pelo microambiente físico e químico dos recipientes de cultivo, como excesso de nutrientes, alta concentração de reguladores de crescimento e baixa irradiância, que podem comprometer a formação das plantas (Casanova et al., 2008). Somado a isso, a produção e o acúmulo de compostos gasosos, bem como modificações nas suas concentrações, podem afetar significativamente o crescimento e a morfogênese em diversos sistemas de cultivo *in vitro* (Marino & Berardi, 2004).

Em sistema de propagação *in vitro* convencional, a concentração de dióxido de carbono (CO₂) geralmente mantém-se na faixa de 0,01 a 3%, a de oxigênio entre 18 e 22%, e a de etileno, em recipientes vedados, aumenta gradualmente com o tempo, atingindo valores acima de 2 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Nguyen & Kozai, 1998). A concentração de gases dentro dos recipientes de cultivo resulta de um balanço dependente das trocas gasosas entre os tecidos cultivados e o microambiente interno, e entre os recipientes e a sala de crescimento (Marino & Berardi, 2004).

A produção do etileno é influenciada pelos métodos de cultivo *in vitro*, como composição do meio, tipo de explante e vedação dos frascos (Chandra et al., 1997), sendo regulada por sinais internos durante o desenvolvimento, e em resposta a

estímulos ambientais resultantes de estresses bióticos e abióticos, tais como injúria, hipoxia, ozônio, injúria por frio ou congelamento (Wang et al., 2002). Além disso, a utilização de reguladores de crescimento, tais como as citocininas e as auxinas, pode induzir a produção de etileno (Yang & Hoffman, 1984; Mok & Mok, 2001).

Utilizando sistemas de vedação variados, Barbosa (2006) relatou que em vedação com policloreto de vinila (PVC) houve produção de altos níveis de etileno no meio indutor e não indutor de hiperidricidade, indicando que esse tipo de vedação pode contribuir para o desenvolvimento de hiperidricidade em porta enxerto de videira VR043-43 e de outras anormalidades ligadas ao acúmulo de gases no interior do frasco de cultivo.

Os sistemas de vedação também podem ter efeito sobre o transporte e absorção de nutrientes *in vitro*. Os minerais exercem importante papel não apenas no crescimento, mas também na regulação da morfogênese. Seu fornecimento, absorção, transporte e metabolismo parecem variar entre os estágios de desenvolvimento dos órgãos, iniciação dos meristemas e durante o crescimento (Ramage & Williams, 2002).

As quantidades fornecidas e o balanço de nutrientes são fatores determinantes da sua utilização pelas plantas *in vitro* (Diniz et al., 1999). Pesquisas com minerais geralmente são focadas no crescimento, mas não na morfogênese, havendo pouca informação entre absorção mineral e este processo. Uma das dificuldades no estudo da nutrição mineral *in vitro* é distinguir entre os efeitos do crescimento e os do desenvolvimento, pois alguns minerais podem ter importante papel na regulação do desenvolvimento, assim como na sua manutenção (Ramage & Williams, 2002).

Dessa forma, esse trabalho teve como objetivos caracterizar a influência da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na organogênese, nutrição e trocas gasosas do porta-enxerto de videira VR043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultivo do material vegetal em meio indutor de calogênese

Segmentos nodais do porta-enxerto de videira VR043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*), contendo uma folha, foram utilizados como explantes e inoculados em frascos de vidro com capacidade para 267 ± 5 mL, contendo aproximadamente 40 mL de meio de cultura. O meio foi composto por 50% da concentração dos sais MS (Murashige & Skoog, 1962) e 100 % das vitaminas MS, suplementado com 100 mg L^{-1} de *bio*-inositol, 30 g L^{-1} sacarose, solidificado com $6,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar (Merck®, Alemanha), pH 5,8, e autoclavado a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, 1,1 atm de pressão, por 15 minutos. O meio foi suplementado ou não com 6-benzilaminopurina (BAP), à concentração de $4,44 \text{ } \mu\text{M}$.

Os frascos foram vedados com duas camadas de PVC transparente (Goodfilm®, Brasil) e mantidos em sala de crescimento a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 16 horas, em irradiância de aproximadamente $40 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ pelos períodos de 15, 30 e 45 dias.

2.2. Cromatografia gasosa

A quantificação do O_2 foi realizada no Laboratório de Pós-Colheita do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em cromatógrafo a gás Shimadzu GC-14B, utilizando coluna de aço inoxidável de 2m x 118” com peneira molecular de 80 a 100 mesh a $83 \text{ }^\circ\text{C}$, injetor a $100 \text{ }^\circ\text{C}$, detector de condutividade térmica (TCD) a $150 \text{ }^\circ\text{C}$, empregando nitrogênio como gás de arraste.

Para determinação dos níveis de CO_2 utilizou-se coluna de aço inoxidável, empacotada com Poropak-Q, à temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$, injetor a $100 \text{ }^\circ\text{C}$, e a $150 \text{ }^\circ\text{C}$, tendo o nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de 30 mL s^{-1} .

Três amostras da atmosfera dos frascos por repetição foram coletadas para cada análise, utilizando seringa BD Ultra-Fine® 29G, de 1 mL de capacidade, meia polegada de comprimento e calibre de 0,33 mm.

2.3. Digestão nitroperclórica do material vegetal

Aproximadamente 100 mg de massa seca da parte aérea obtidos aos 15, 30 e 45 dias de cultivo foram digeridos em 4 mL de mistura nitroperclórica (3:1), após pré-digestão de \pm 8 horas, pela elevação gradual da temperatura até 250 °C. Completou-se o volume do extrato para 25 mL após passagem por filtro Whatman[®] n° 3, analisado posteriormente em fotômetro de chama para determinação dos teores de K, e em espectrofotômetro de emissão em plasma de argônio indutivamente acoplado para os demais elementos.

2.4. Delineamento experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e esquema fatorial 3 x 2 [três períodos de coleta e duas concentrações de BAP (0 e 4,44 μ M)], contendo dez repetições, sendo cada unidade experimental constituída por um frasco com quatro explantes.

Para determinação dos níveis de dióxido de carbono (CO₂) e oxigênio (O₂) foram coletadas amostras da atmosfera interna dos frascos após 15, 30 e 45 dias de cultivo, empregando tampas plásticas com septos de silicone e seringas. Utilizou-se para tanto 5 repetições por tratamento.

Como controles foram utilizados frascos contendo apenas meio de cultura sem BAP (C1) e frascos com meio suplementado com BAP (C2). Para análise de macro e micronutrientes a unidade experimental foi constituída por 2 frascos com 4 explantes cada.

As avaliações foram realizadas a cada 15 dias, tendo como características analisadas: número de gemas, ramos, folhas e primórdios foliares; massa fresca da parte aérea, das raízes ou calos. O material foi desidratado em estufa com ventilação forçada a 60 °C até atingir peso constante, e posteriormente digerido para determinação dos teores de macro e micronutrientes da parte aérea.

3. RESULTADOS

3.1. Crescimento e desenvolvimento

Foram observados, aos 7 dias de cultivo, primórdios radiculares em meio sem adição de BAP (MS0), e formação de brotações no meio contendo 4,44 μ M de BAP. Aos 15 dias verificaram-se ramos em ambos os tratamentos (Figuras 1A e 1B). No entanto, na adição de BAP, observou-se maior número de gemas e folhas, porém pouco expandidas e com lóbulos mais proeminentes em comparação ao controle (Figura 1B). Houve também início de calejamento neste tratamento (Figura 1D) contrastando com o enraizamento em meio sem regulador (Figura 1C).

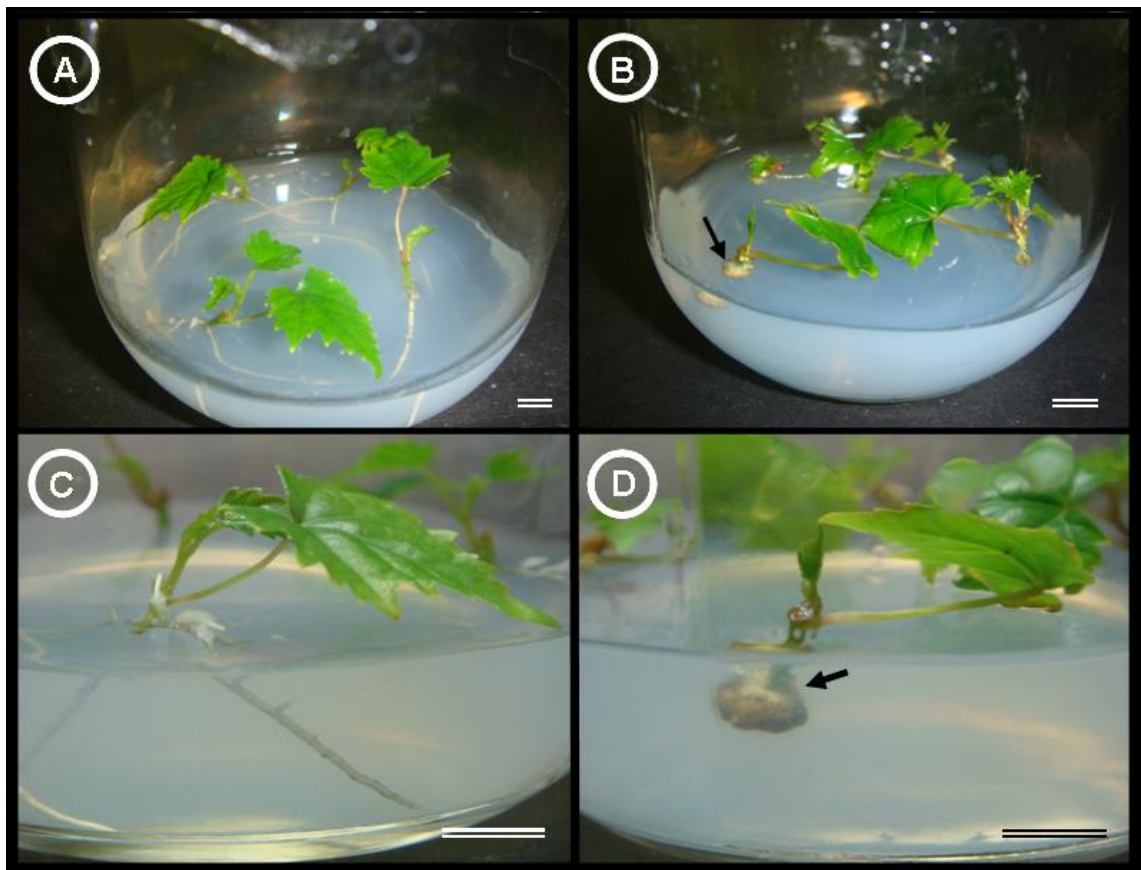


Figura 1: Regeneração de porta-enxerto de videira VR043-43 a partir de explantes nodais, em meios MS0 (A e C) e suplementado com 4,44 μ M de BAP (B e D), aos 15 dias de cultivo. Barras = 0,5 cm.

Aos 28 dias, os explantes em meio suplementado com BAP apresentaram variações no calejamento, formando calos compactos e pequenos a semifriáveis e volumosos. Com 45 dias de cultivo as plantas em meio com citocinina apresentaram,

além do calejamento heterogêneo (Figuras 2B, 2C e 3C), múltiplas brotações, caule pigmentado com antocianina com entrenós curtos; folhas pouco expandidas, encarquilhadas e cloróticas (Figura 2A direita), e limbo com lóbulos proeminentes (Figuras 2D e 3B). As plantas em meio MS0 apresentaram folhas expandidas, de coloração verde intenso e com maior área foliar, formando apenas um ramo com entrenós alongados e sistema radicular desenvolvido (Figuras 2A esquerda e 3A).



Figura 2: Plantas do porta-enxerto de videira VR043-43 regeneradas de explantes nodais em meio MS0 (esquerda) e suplementado com 4,44 μ M de BAP (direita), aos 45 dias de cultivo (A). Detalhe do calejamento intenso (B) e calo compacto (C, seta). Folhas com aspecto encarquilhado (D, seta). Barras = 1 cm em A; 0,5 cm de B a D.

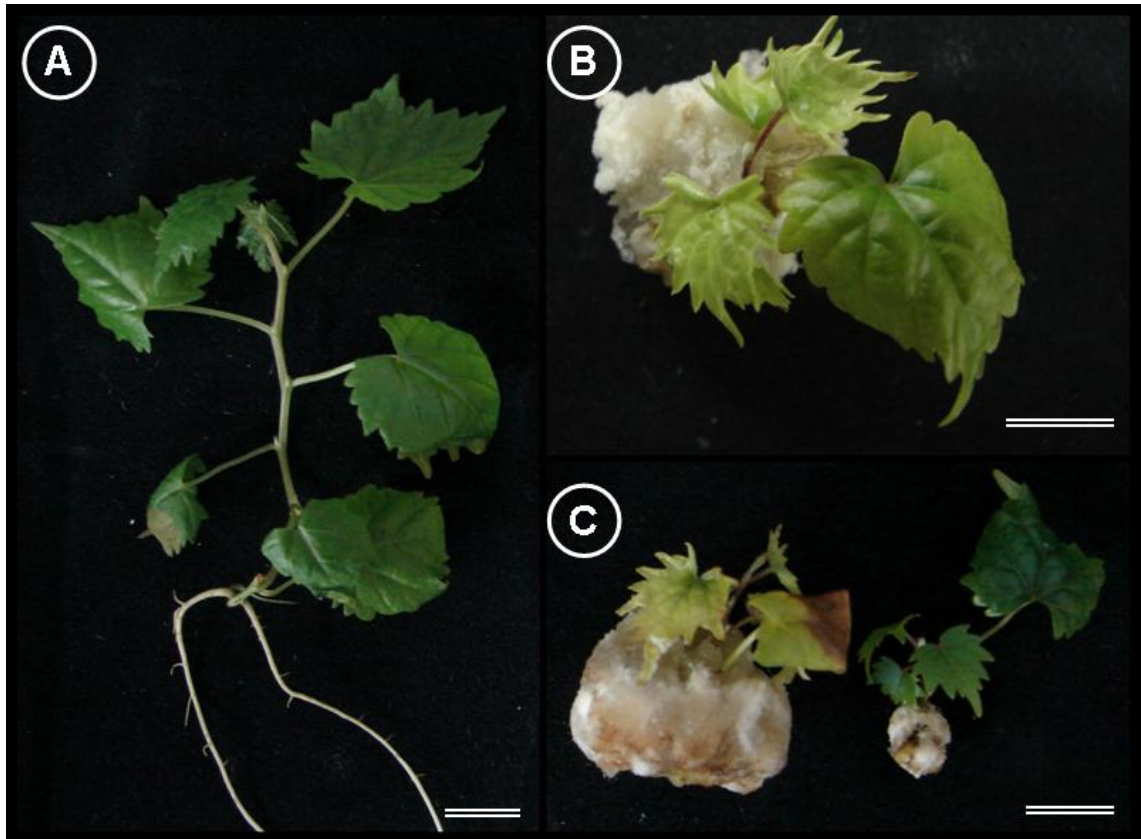


Figura 3: Plantas do porta-enxerto de videira VR043-43 regeneradas de explantes nodais em meio MS0 (A) e suplementado com 4,44 μM de BAP, aos 45 dias de cultivo (B e C). Folhas pouco expandidas e encarquilhadas (B). Variação de calejamento (C) e diferença no tamanho das plantas regeneradas nos diferentes meios de cultivo (A e C). Barras = 1 cm.

Observou-se incremento no número de ramos regenerados no meio MS0 dos 15 aos 30 dias após a inoculação, permanecendo estável até os 45 dias de cultivo. Entretanto, no meio com BAP houve aumento no número de ramos durante todo o período de cultivo, superando os valores obtidos no tratamento sem o fitorregulador (Figura 4A). Em meio MS0 o número de primórdios foliares aumentou dos 15 para os 30 dias de cultivo, mas decresceu aos 45 dias, assumindo menor valor que o obtido na primeira avaliação (Figura 4B).

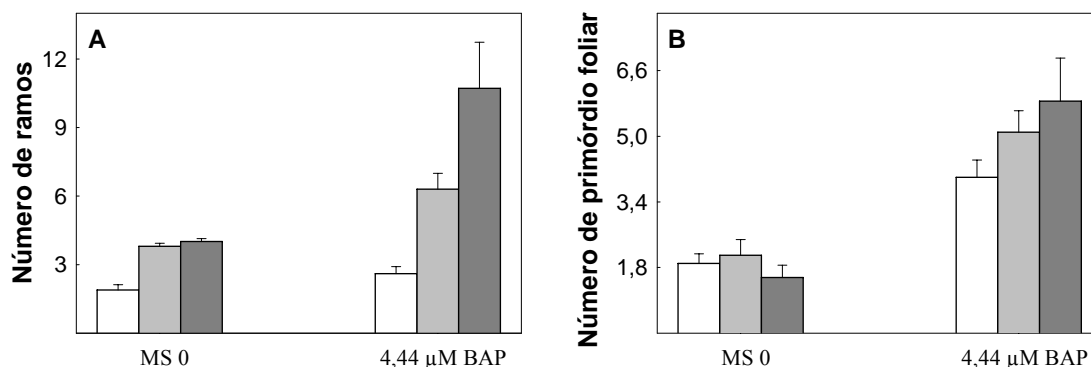


Figura 4: Médias do número de ramos e de primórdios foliares do porta-enxerto de videira VR043-43 em meios MS0 e MS suplementado com 4,44 μM de BAP, aos 15 (□), 30 (▣) e 45 (■) dias de cultivo. As barras representam o erro padrão das médias.

Houve aumento no número de gemas em ambos os tratamentos, sendo que nos meios suplementados com citocinina este número foi maior em todos os períodos avaliados (Figura 5A). O mesmo ocorreu em relação ao número de folhas, exceto aos 45 dias, onde não foi observada diferença entre os tratamentos (Figura 5B). Considerou-se para essa variável apenas folhas expandidas.

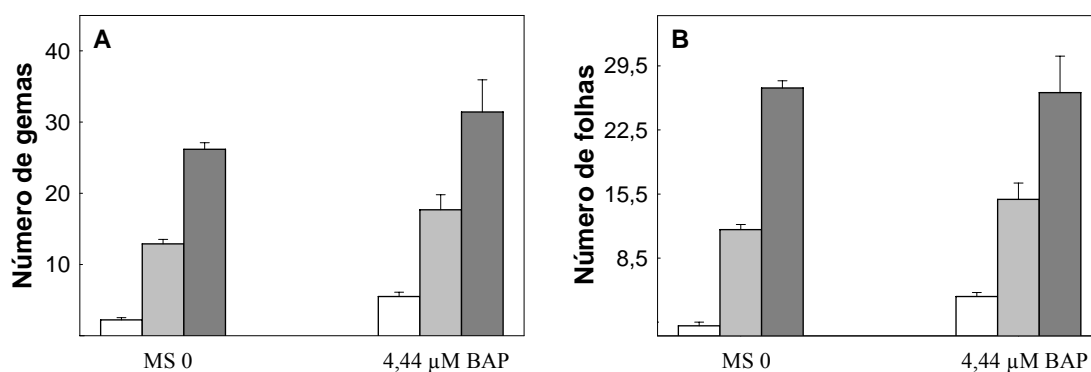


Figura 5: Médias do número de gemas e de folhas do porta-enxerto de videira VR043-43 em meios MS0 e MS suplementado com 4,44 μM de BAP, aos 15 (□), 30 (▣) e 45 (■) dias de cultivo. As barras representam o erro padrão das médias.

Aos 15 dias de cultivo a massa fresca da parte aérea das plantas em meio contendo BAP foi maior do que em meio MS0 (Figura 6A). No entanto, aos 30 e 45 dias de cultivo os valores obtidos em meio MS0 superaram os observados no tratamento com BAP (Figura 6A). Aos 15 dias a massa fresca do sistema radicular foi maior no meio MS0 do que a dos calos em meio com citocinina. Observou-se

incremento uniforme na massa do sistema radicular em meio MS0 ao longo das avaliações, enquanto no meio com BAP os calos formados apresentaram maior massa dos 15 aos 30 dias, sendo menos expressivo aos 45 dias de cultivo (Figura 6B).

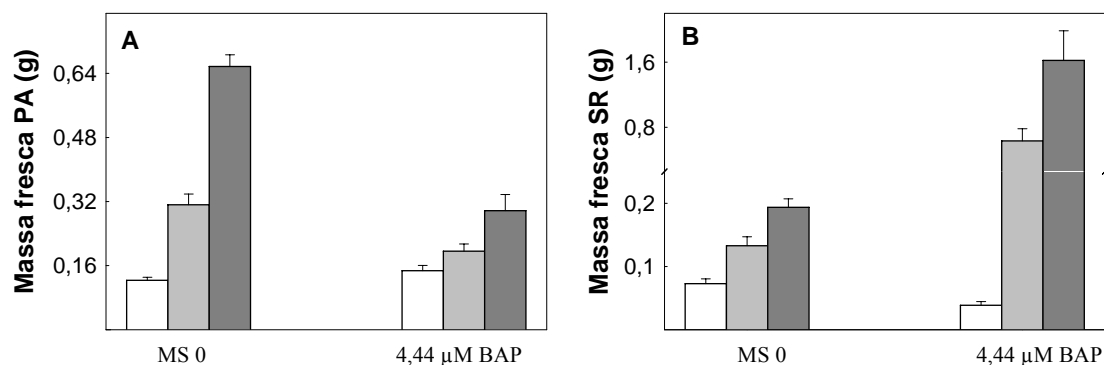


Figura 6: Médias de massa fresca (g) da parte aérea (PA) e do sistema radicular/calco (SR) do porta-enxerto de videira VR043-43 em meios MS0 e MS suplementado com 4,44 μM de BAP, aos 15 (□), 30 (▨) e 45 (■) dias de cultivo. As barras representam o erro padrão das médias.

Houve incremento de massa de massa seca da parte aérea nos dois meios de cultivo ao longo do tempo (Figura 7A). Contudo, os valores obtidos aos 30 dias nos dois tratamentos não diferiram entre si. A massa seca das raízes das plantas cultivadas em meio MS0 aumentou de forma homogênea ao longo do cultivo (Figura 7B). Embora os calos formados em meio com BAP tenham apresentado ganho de massa seca dos 15 aos 30 dias, esse foi menos pronunciado aos 45 dias (Figura 7B).

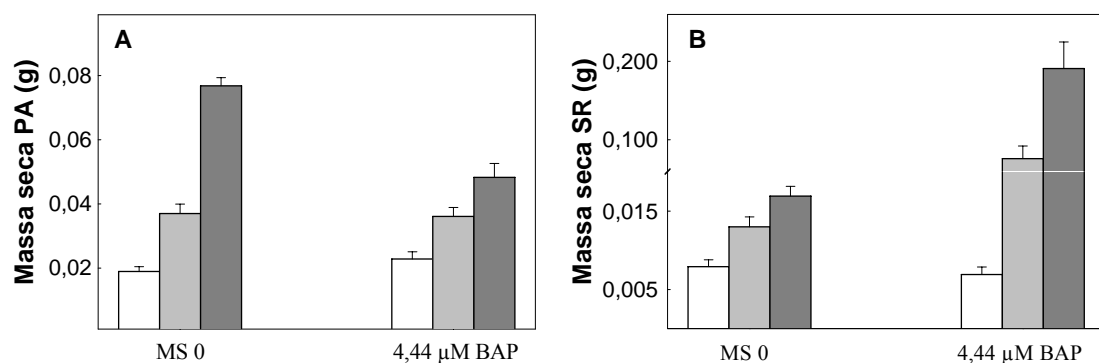


Figura 7: Médias da massa seca (g) da parte aérea (PA) e do sistema radicular/calco (SR) do porta-enxerto de videira VR043-43 em meios MS0 e MS suplementado com 4,44 μM de BAP, aos 15 (□), 30 (▨) e 45 (■) dias de cultivo. As barras representam o erro padrão das médias.

A massa fresca total, referente à planta inteira, não diferiu entre os meios de cultivo aos 15 dias (Figura 8A). Em ambos os tratamentos houve incremento nos períodos avaliados, porém os valores foram maiores em meio com BAP. O aumento da massa seca total em meio com BAP foi pronunciado ao longo do cultivo (Figura 8B).

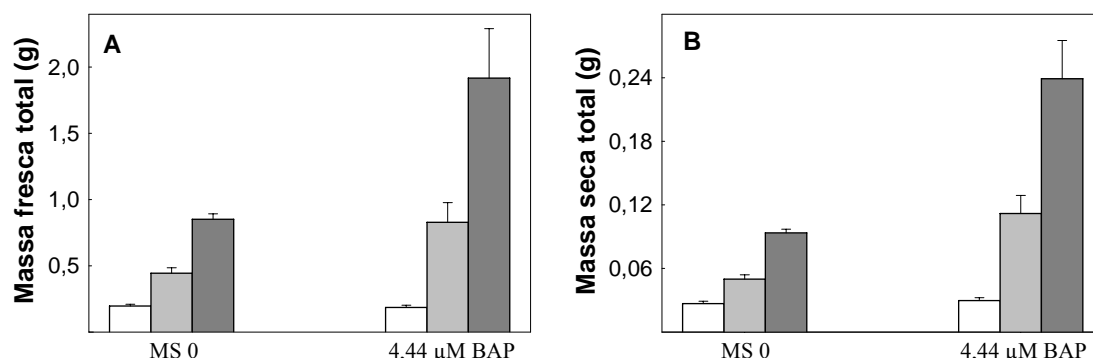


Figura 8: Médias de massa fresca e de massa seca total (g) de plantas do porta-enxerto de videira VR043-43 em meios MS0 e MS suplementado com 4,44 μM de BAP, aos 15 (□), 30 (▤) e 45 (■) dias de cultivo. As barras representam o erro padrão das médias.

3.2. Teores de macro e micronutrientes da parte aérea

Os teores de fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), ferro (Fe) e manganês (Mn) da parte aérea das plantas obtidas em meio sem regulador aumentaram ao longo do cultivo (Figura 10). Nesse meio, o teor de potássio (K) foi maior aos 30 do que aos 15 dias, com leve queda aos 45 dias de cultivo (Figura 10). Os teores de zinco (Zn) em meio MS0 não diferiram aos 15 e 30 dias, mas foram maiores aos 45 dias (Figura 10), enquanto o teor de cobre (Cu) foi menor aos 30 do que aos 15 dias de cultivo, porém a quantidade encontrada aos 45 dias superou a inicial (Figura 11).

Em meio contendo BAP, o conteúdo de P na parte aérea das plantas foi igual aos 15 e 30 dias, aumentando aos 45 dias após a inoculação (Figura 10 A). Os níveis de Ca, K e Zn foram menores aos 30 dias de cultivo, aumentando aos 45 dias (Figura 10), atingindo valores superiores aos encontrados na primeira avaliação no caso do

Ca. Os teores de Mg, S e Mn aumentaram ao longo do cultivo (Figura 10), enquanto os de Fe e Cu (Figuras 10 F e 11) diminuíram gradativamente em meio com BAP.

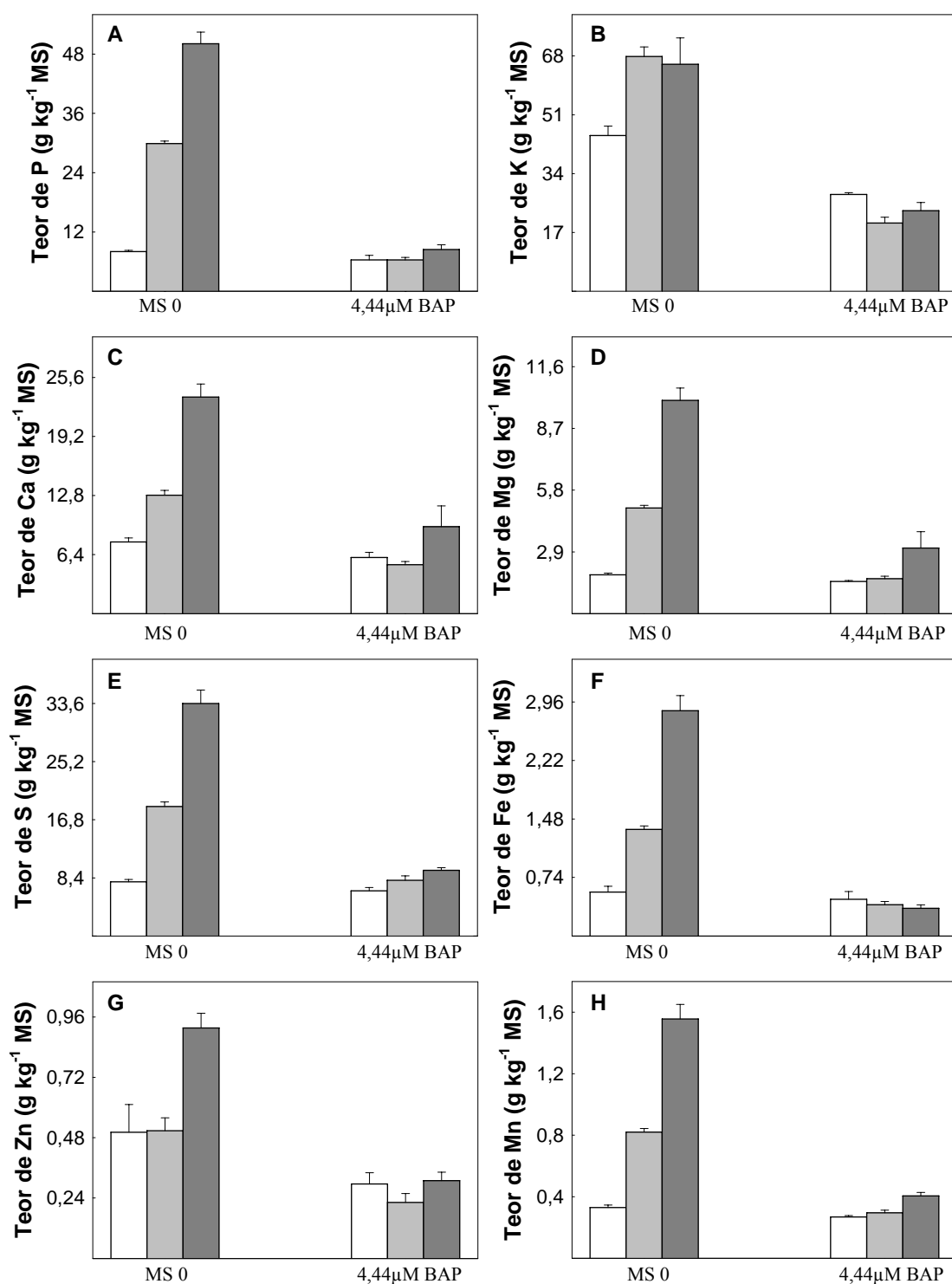


Figura 10: Teores de macro e micronutrientes ($\text{g kg}^{-1} \text{MS}$) da parte aérea do porta-enxerto de videira VR043-43 em meios MS0 e MS suplementado com $4.44 \mu\text{M}$ de BAP, aos 15 (\square), 30 (\square) e 45 (\blacksquare) dias de cultivo, respectivamente. As barras representam o erro padrão das médias.

Aos 15 dias de cultivo, os teores de P, Mg, S, Fe e Mn obtidos na parte aérea das plantas desenvolvida nos dois meios de cultura foram próximos, enquanto os de Ca, e principalmente os de K e de Zn, foram maiores na parte aérea das plantas obtidas em meio MS0. Os níveis dos macro e micronutrientes determinados na parte aérea das plantas foram maiores em meio sem citocinina do que em meio com BAP aos 30 e 45 dias de cultivo (Figuras 10 e 11).

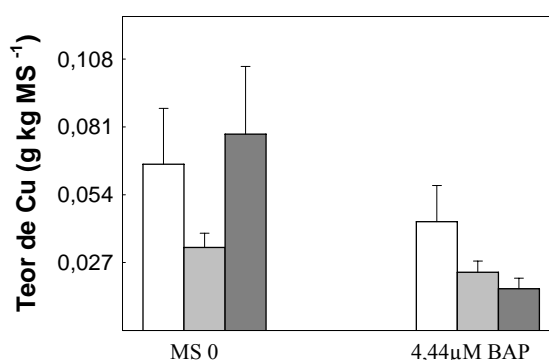


Figura 11: Teores de Cu ($\text{g kg}^{-1} \text{MS}$) da parte aérea do porta-enxerto de videira VR043-43 em meios MS0 e MS suplementado com $4,44 \mu\text{M}$ de BAP, aos 15 (□), 30 (■) e 45 (■) dias de cultivo, respectivamente. As barras representam o erro padrão das médias.

3.3. Níveis de CO_2 e O_2 acumulados na atmosfera interna

Observou-se variação da porcentagem de CO_2 e O_2 na atmosfera interna nos frascos controle, sem explantes (C1 e C2), ao longo do tempo (Figura 12). A porcentagem de CO_2 nos frascos controle contendo meio MS0 diminuiu aos 30 dias. Já aos 45 dias de experimentação a porcentagem de CO_2 equiparou-se à da primeira (Figura 12A), enquanto a porcentagem de O_2 reduziu (Figura 12B). Nos frascos controle, contendo meio suplementado com BAP, a porcentagem de CO_2 aumentou aos 45 dias, enquanto a de O_2 diminuiu aos 30 dias, aumentando aos 45 dias até valores próximos aos registrados aos 15 dias após a inoculação.

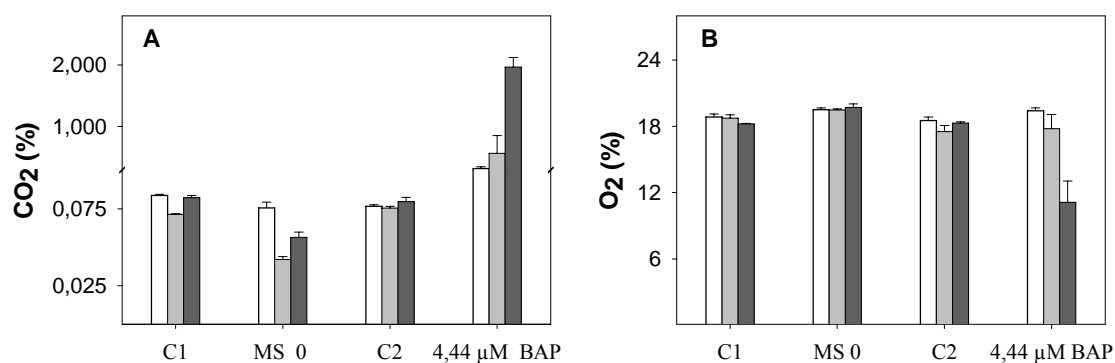


Figura 12: Porcentagem de CO₂ e O₂ nos frascos com (MS0 e MS + 4,44 μM BAP) e sem explantes (C1:MS0 e C2: MS + 4,44 μM BAP) aos 15 (□), 30 (▣) e 45 (■) dias de cultivo do porta-enxerto de videira VR043-43. As barras representam o erro padrão das médias.

No tratamento com meio MS0, a concentração de CO₂ foi menor nos frascos contendo explantes em todos os períodos analisados, principalmente aos 30 e 45 dias (Figura 12A), enquanto os níveis de O₂ foram maiores em todas as medições, evidenciado aos 45 dias (Figura 12B).

Os frascos com meio MS suplementado com BAP contendo explantes apresentaram maior porcentagem de CO₂ em todas as avaliações quando comparado ao seu respectivo controle, principalmente aos 45 dias (Figura 12A). A porcentagem de O₂ foi maior nos frascos com explantes aos 15 dias, equiparando-se ao controle aos 30 dias e apresentando menor porcentagem aos 45 dias (Figura 12B).

A diferença na porcentagem de CO₂ entre os tratamentos foi expressiva em todos os períodos avaliados, principalmente aos 45 dias (Figura 12A). A porcentagem de O₂ não variou entre os tratamentos aos 15 dias, porém aos 30 e 45 dias a porcentagem de O₂ no tratamento com BAP foi menor que nos frascos contendo meio MS0 (Figura 12B).

A Figura 13 representa a variação da quantidade de CO₂ e O₂, nos frascos, expressa pelo número de explantes, descontadas as quantidades mensuradas nos frascos controle com os respectivos meios de cultura. Observou-se que a quantidade de CO₂ por explante nos frascos com meio MS0 permaneceu praticamente constante, com tendência a leve queda, enquanto no tratamento com BAP houve aumento da quantidade de CO₂ nos frascos dos 15 aos 30 dias, com incremento deste aos 45 dias

(Figura 13A). Nota-se ainda que a quantidade de CO₂ foi menor nos frascos contendo meio sem BAP do que a acumulada naqueles com a referida citocinina.

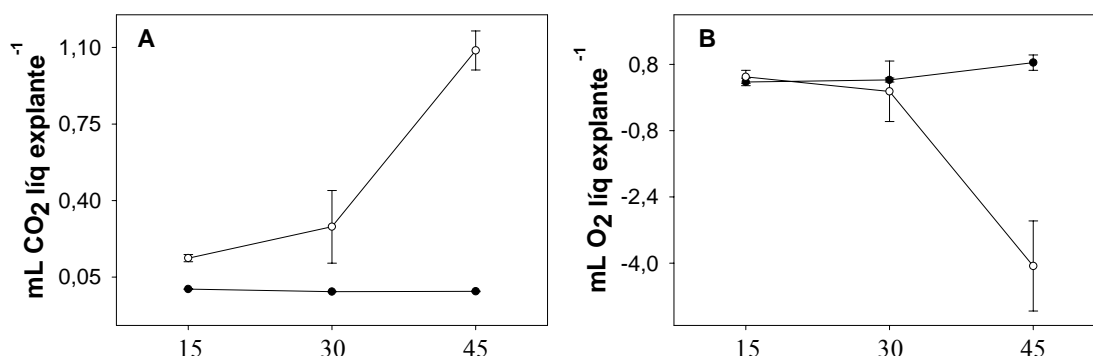


Figura 13: Quantidade de CO₂ e O₂ (mL líquido explante⁻¹) nos frascos com explantes em meios MS0 (●) e MS suplementado com 4,44 μM de BAP (○), aos 15, 30 e 45 dias de cultivo do porta-enxerto de videira VR043-43. As barras representam o erro padrão das médias.

A quantidade de O₂ apresentou incremento, ao longo dos períodos analisados, no tratamento com meio MS0, enquanto no tratamento contendo BAP a porcentagem diminuiu dos 15 aos 30 dias, com acentuada redução aos 45 dias (Figura 13B). O nível de O₂ nos tratamentos não diferiu aos 15 dias, tornando-se negativo no tratamento com BAP ao longo do cultivo.

4. DISCUSSÃO

4.1. Crescimento e desenvolvimento

Houve diferença entre as plantas obtidas em meio sem regulador e suplementado com BAP quanto ao crescimento e desenvolvimento, evidenciando a influência desta citocinina na organogênese e no padrão de crescimento (Figura 2A). O BAP induziu a multiplicação de ramos (Figura 4A), a formação de primórdios foliares (Figura 4B) e de gemas (Figura 5B), e a ocorrência de calogênese na base dos explantes. No entanto, esse regulador suprimiu a rizogênese, inibiu o alongamento dos entrenós, promoveu alterações na coloração do caule e alterou o desenvolvimento foliar, comprometendo a expansão e promovendo clorose e alterações na morfologia do limbo no porta-enxerto VR043-43 (Figura 3).

Corroborando com o observado em meio com citocinina, Carimi et al (2004) observaram que altos níveis de BAP aceleraram a senescência de *Arabidopsis thaliana*, induzindo o amarelecimento prematuro das plantas e alterações fisiológicas, tais como redução de massa radicular, indentações nas margens foliares e coloração arroxeadada da nervura mediana.

Em videira, o BAP induziu o aumento do número de primórdios foliares, porém comprometeu a expansão e o desenvolvimento desses órgãos (Figuras 4B e 3C, respectivamente). Em meio MS0, aos 45 dias, o crescimento e expansão das folhas resultou no decréscimo do número de primórdios foliares (Figura 4B).

As plantas de videira obtidas em meio contendo BAP foram menores que as cultivadas em meio sem regulador, apresentando ramos curtos, com folhas pequenas, lâminas mais achatadas e muitas vezes cloróticas. Estas características se assemelharam às observadas em cultura de tabaco com a utilização desta citocinina. O BAP induziu também elevada frequência de formação de ramos e tabaco, sendo que o número induzido e a proporção de explantes com esta reação aumentaram com o tempo de cultivo (Ramage & Williams, 2004).

Aos 15 dias de cultivo, a massa fresca da parte aérea das plantas em meio com BAP superou a das cultivadas em meio MS0, provavelmente decorrente da indução da formação de ramos, evidenciada por brotações na porção apical dos explantes (Figura 6A). A massa fresca da parte aérea foi maior em meio MS0 aos 30 e 45 dias de cultivo, refletindo o alongamento dos entrenós e a expansão foliar das

plantas originadas, em contraste com o limitado crescimento dos ramos e folhas em meio com citocinina (Figura 6A). Além disso, no processo organogênico, explantes de videira requerem prévio enraizamento para a regeneração da parte aérea, o que se estabelece com aproximadamente 15 dias de cultivo.

As massas fresca e seca do sistema radicular em meio MS0 aumentaram uniformemente em função do crescimento normal das raízes. Aos 15 dias, a massa fresca das raízes no meio MS0, já bem desenvolvidas, superou a dos calos em início de crescimento (Figura 6B). Apenas em torno dos 21 dias a calogênese foi notadamente estabelecida em meio com BAP, mantendo o incremento de massa e o crescimento em volume ao longo do tempo.

O BAP comprometeu o crescimento dos ramos de videira, alterando a relação das massas fresca e seca da parte aérea/sistema radicular, induzindo o ganho de massa dos calos em detrimento dos ramos formados (Figuras 6 e 7). Polanco e Ruiz (1997) observaram que o crescimento do sistema radicular e da parte aérea de lentilha *in vitro* foi inibido progressivamente pelo aumento da concentração de BAP. Corroborando com os dados observados neste trabalho.

A diferença entre os valores da massa fresca e da massa seca total, observados entre os meios de cultivo ao longo do tempo, resultou do contraste entre o incremento de massa do sistema radicular formado em meio MS0 e dos calos originados em meio com citocinina (Figura 8).

Os resultados obtidos estão de acordo com trabalhos prévios com o porta-enxerto VR043-43, onde a altura das brotações diminuiu e o número de folhas e a massa fresca total aumentaram com o incremento da concentração de BAP (Barbosa, 2006; Machado, 2006).

Em cultivo de porta-enxertos de videira, a adição de 2,5 a 20 μM de BAP ao meio promoveu calogênese na base dos explantes e estimulou o crescimento dos ápices meristemáticos e segmentos nodais (Biasi et al., 1998). O mesmo não foi observado no cultivo de VR043-4343 em relação à parte aérea formada, visto que o crescimento das plantas foi comprometido.

4.2. Teores de macro e micronutrientes da parte aérea

O teor de nutrientes na parte aérea das plantas, obtidas nos meios utilizados aos 15 dias após a inoculação, praticamente não diferiu para a maioria dos elementos mensurados (Figuras 10 e 11). A absorção de nutrientes em meio com BAP provavelmente foi comprometida pelos calos, estabelecidos a partir dos 21 dias de cultivo. Em meio MS0, as plantas dispunham de sistema radicular desenvolvido, favorecendo a absorção de nutrientes, o que pode justificar a diferença entre tratamentos dos teores dos elementos analisados na parte aérea. Os calos podem ter influenciado a absorção e translocação de nutrientes para a parte aérea, agindo como barreira mecânica ao fluxo de massa e à difusão

Alexandre (2006) obteve resultados similares trabalhando com plantas de *Passiflora*, em meio contendo BAP. Este constatou que utilizando esta citocinina houve menores teores de macro e de micronutrientes, folhas cloróticas, não formação de raízes e calogênese, o que pode ter interferido na absorção de nutrientes, constituindo em uma barreira física.

A diferença nas concentrações dos elementos avaliados na parte aérea das plantas formadas em meio com e sem BAP (Figuras 10 e 11) indicaram que esta citocinina interferiu na nutrição e na organogênese dos explantes de videira, evidenciado pelas alterações morfológicas das plantas originadas em meio com regulador.

Da mesma forma, foram observadas alterações das concentrações dos minerais em plantas de tabaco, com aumento dos níveis de BAP no meio de cultivo, o que foi associado à morfologia anormal dos ramos (Ramage & Williams, 2004).

O decréscimo da concentração de Fe e de Cu (Figuras 10F e 11) na parte aérea das plantas cultivadas em meio com BAP ao longo do cultivo podem explicar a clorose das folhas formadas. Esta alteração evidencia a influência desta citocinina na nutrição dos explantes e conseqüente prejuízo à organogênese e ao crescimento satisfatório. Os sintomas de deficiência de Fe e de Cu, geralmente, surgem primeiro nas folhas jovens e no ápice da planta, pois o dreno da parte vegetativa parece não ter a capacidade de produzir um sinal suficientemente forte para induzir a senescência das folhas e incrementar a mobilização desses micronutrientes nas células das folhas mais velhas (Fontes, 2001).

4.3. Níveis de CO₂ e O₂ acumulados na atmosfera interna

Contrastando a porcentagem de CO₂ e O₂ nos frascos com e sem explantes, contendo o mesmo meio, nota-se que houve variação da concentração dos gases analisados, decorrentes dos processos morfogênicos, transpiratórios e fotossintéticos.

O material vegetal cultivado *in vitro* possui capacidade fotossintética limitada em função em condições de cultivo heterotrófico (Hazarika, 2006). Consequentemente, as menores concentrações de CO₂ e maiores níveis de O₂ nos frascos com meio MS0 contendo explantes, em comparação ao seu controle, provavelmente devem-se à fixação do CO₂ e produção de O₂ pelo processo fotossintético (Figuras 12A e B). A maior porcentagem de CO₂ e menor porcentagem de O₂ nos frascos com BAP contendo explantes, em comparação ao seu controle, podem ter decorrido da intensa respiração ao longo da diferenciação e do calejamento dos explantes (Figuras 12A e B).

Em *Herreria salsaparilha* a concentração de oxigênio em frascos com explantes vedados com uma e duas camadas de PVC foi maior do que em frascos sem explantes cultivados *in vitro*, o que parece resultar do fato de que o O₂ produzido pela fotossíntese após as duas primeiras semanas de cultivo não foi totalmente consumido pela respiração (Gonçalves et al., 2008).

Em videira a manutenção dos níveis de O₂ e de CO₂ em MS0, onde há regeneração de plantas saudáveis, pode ter resultado do equilíbrio entre o consumo, pelo processo fotossintético, e a produção, via respiração. No meio com BAP, a qualidade morfofisiológica da parte aérea certamente comprometeu a atividade fotossintética, o que somado à intensa proliferação de calos, que requer alta atividade respiratória, resultou no acúmulo de CO₂ na atmosfera interna dos frascos e decréscimo da quantidade de O₂ (Figuras 13A e B). Resultados semelhantes foram observados no cultivo de batata, onde nos tratamentos que não houve formação de calos as concentrações de CO₂ permaneceram relativamente constantes ou diminuíram, especialmente naqueles com pouca ventilação (Zobayed et al., 2001).

Comportamento semelhante também foi verificado no cultivo de batata, onde houve decréscimo da concentração de oxigênio pelo aumento da demanda respiratória associada à calogênese, ao desenvolvimento do sistema radicular; e possivelmente a algum grau de senescência dos tecidos fotossintéticos (Zobayed et al., 2001).

A taxa respiratória de *H. salsaparilha* permaneceu relativamente constante durante o tempo de experimentação, no entanto, após o sétimo dia a produção de CO₂ pela respiração foi menor do que seu consumo na fotossíntese (Gonçalves et al., 2008). Enquanto que a concentração de CO₂ durante a formação de ramos a partir de folhas de marmelo diminuiu com o tempo de cultivo (Marino et al., 2004).

Gonçalves et al. (2008), ao observar a formação de um domo em frascos vedados com uma e duas camadas de PVC, atribuíram a expansão desse material ao acúmulo de O₂ no frasco. O mesmo foi observado em videira ao longo do tempo de experimentação, havendo dinamismo na formação da concavidade ao longo do dia e do tempo de cultivo.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que o BAP comprometeu a organogênese do porta-enxerto de videira VR043-43, promovendo calogênese na base dos explantes, inibindo a rizogênese, o alongamento dos entrenós e a expansão foliar. Além disso, o BAP alterou a relação da massa fresca e seca da parte aérea/sistema radicular em detrimento dos ramos em formação.

A utilização de BAP promoveu redução da perda de água dos frascos de cultivo para a atmosfera externa. A diferença da perda de água entre os frascos com e sem citocinina indicou alta absorção durante a calogênese. A absorção de grande quantidade de água alterou o potencial osmótico do meio de cultivo, diminuindo o potencial hídrico e a disponibilidade dos nutrientes para as plantas formadas.

As plantas desenvolvidas nos meios com e sem BAP alteraram a composição da atmosfera dos frascos de cultivo. Nos frascos com citocinina o maior acúmulo de CO₂ e consumo de O₂ na atmosfera refletiu o comprometimento da atividade fotossintética dos ramos formados e a elevada taxa respiratória dos calos. O acúmulo de CO₂ nos frascos de cultivo e a baixa concentração de O₂ nos frascos com BAP evidenciam a limitação das trocas gasosas imposta pelo tipo de vedação, comprometendo o crescimento e o desenvolvimento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, R.S. *Fatores de estresse na germinação de sementes e na propagação in vitro de Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener*. Viçosa: UFV, 166 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

BARBOSA, L.M.P. *Caracterização anatômica e bioquímica da hiperhidricidade em morangueiro (Fragaria x ananassa Duch.) e videira (Vitis vinifera x Vitis rotundifolia) propagados in vitro*. Viçosa: UFV, 2006. 128 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

BIASI, L. A.; PASSOS, I. R. DA S.; POMMER, C. V. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de videira através de ápices meristemáticos e segmentos nodais. *Scientia Agricola*, 55:196-202, 1998.

BRZOBOHATÝ, B.; MOORE, I.; PALME, K. Cytokinin metabolism: implications for regulation of plant growth and development. *Plant Molecular Biology*, 26:1483-1497, 1994.

CARIMI, F.; TERZI, M.; MICHELE, R.; ZOTTINI, M.; SCHIAVO, F. High levels of the cytokinin BAP induce PCD by accelerating senescence. *Plant Science*, 166:963-969, 2004.

CASANOVA, E.; MOYSSET, L.; TRILLAS, M.I. Effects of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. *Biologia Plantarum*, 52: 1-8, 2008.

CHANDRA, R.; KIIETARPAI, S.; POLISETTY, R. Effect of plant growth regulators on evolution of ethylene and methane by different explants of chickpea. *Biologia Plantarum*, 40:337-343, 1997.

DINIZ, J. D. N.; HERNANDEZ, F. F. F.; GONÇALVES, A. N.; TORRES, A. C. Absorção de macronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34:1201-1209, 1999.

FONTES, P.C.R. *Diagnóstico do estado nutricional das plantas*. Editora UFV, 122p, 2001.

GONÇALVES, L.A.; GERALDINE, R.M.; PICOLI, E.A.T.; VENDRAME, W.A.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. In vitro propagation of *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 92:243-250, 2008.

HABERER, G.; KIEBER, J.J. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiology*, 128:354–362, 2002.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108:105–120, 2006.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B.R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51:49-56, 1997.

MACHADO, M. P. *Micropropagação do porta-enxerto de videira 'VR043-43' (Vitis vinifera L. x Vitis rotundifolia Michx.)*. Curitiba: UFPR, 2006. 83 p. Dissertação (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, 2006.

MARINO, G.; BERARDI, G. Different sealing materials for petri dishes strongly affect shoot regeneration and development from leaf explants of quince 'BA 29'. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40:384-388, 2004.

MOK, D.W.S.; MOK, M.C. Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52:89–118, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497, 1962.

NGUYEN, Q.T.; KOZAI, T. Environmental Effects on the Growth of Plantlets in Micropropagation. *Environment Control in Biology*, 36:59-75, 1998.

POLANCO M.C.; RUIZ, M.L. Effect of benzylaminopurine on in vitro and in vivo root development in lentil, *Lens culinaris* Medik. *Plant Cell Reports*, 17: 22–26, 1997.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 38:116-124, 2002.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Cytokinin-induced abnormal shoot organogenesis is associated with elevated Knotted1-type homeobox gene expression in tobacco. *Plant Cell Reports*, 22:919–924, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. 4. ed. Sunderland: Sinauer Editoria, 2006. 764p.

WANG, K.L.C.; LI, K.; ECKER, J.R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell*, 14:S131-S151, 2002.

YANG, S.F.; HOFFMAN, N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35:155-89, 1984.

ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Micropropagation of potato: evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization. *Annals of Botany*, 87:53-59, 2001.

CAPÍTULO II

HIPERIDRICIDADE NO PORTA-ENXERTO ‘VR 043-43’ (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) INDUZIDA PELO BAP

1. INTRODUÇÃO

Plantas *in vitro* crescem em pequenos frascos, onde são expostas a sais, carboidratos e reguladores de crescimento em altas concentrações, além de alta umidade relativa e baixa irradiância, o que interfere nos potenciais hídrico e osmótico do meio, bem como nas trocas de CO₂ e O₂ entre o interior dos frascos e o ambiente externo (Ziv, 1995; Park et al., 2004). Isto frequentemente ocasiona o surgimento de desordens que dificultam o processo organogênico e, conseqüentemente, seu desenvolvimento. Diferentes condições de estresse, tais como, alta umidade, altos níveis de reguladores de crescimento (principalmente citocininas), acúmulo de gases nos recipientes de cultivo e baixa intensidade luminosa levam ao desenvolvimento, nos tecidos cultivados, da desordem morfológica e fisiológica denominada hiperidricidade (Ziv, 1991; Franck et al., 2004; Saher et al., 2004).

A hiperidricidade envolve fatores múltiplos que, dependendo de respostas fisiológicas específicas a determinadas condições de cultura e da espécie envolvida, é expressa em níveis variados de alterações morfogênicas (Ziv, 1991). Plantas hiperídricas caracterizam-se pelo aspecto translúcido de suas folhas, decorrente do menor conteúdo de clorofilas, parede celular pouco desenvolvida e grande conteúdo de água. Anatomicamente, brotos hiperídricos apresentam hipertrofia do parênquima lacunoso, reduzido número de células no parênquima paliçádico, mesofilo com grandes espaços intercelulares, além de baixa lignificação de vasos e traqueídes, com tecido vascular pouco desenvolvido (Ziv, 1991; Apóstolo & Llorente, 2000; Picoli et al., 2001; Park et al., 2004; Kevers et al., 2004; Chakrabarty et al., 2005; Reyes-Vera et al., 2008).

A frequência de brotações hiperídricas pode estar relacionada ao tipo de vedação dos recipientes de cultivo, os quais podem levar ao acúmulo de etileno e/ou ao aumento da umidade relativa dentro dos frascos (Fontes et al., 1999).

O conteúdo de água nos espaços intercelulares pode reduzir as trocas gasosas, promovendo condições adicionais ao estresse, como hipoxia celular ou alterações das trocas de CO₂ e etileno (Franck et al., 2004). O acúmulo excessivo de etileno, especialmente nos estágios mais tardios do cultivo *in vitro*, pode ser um dos principais fatores indutores da hiperidricidade (Park et al., 2004).

Compreender os requisitos nutricionais é também outro aspecto vital para regeneração satisfatória de propágulos de alta qualidade; devido ao estresse associado ao ambiente, outros suplementos, tais como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento, são necessários (Ramage & Williams, 2002).

Plantas hiperídricas adaptam-se preservando a homeostase do sistema redutor e minimizando o requerimento energético em detrimento de sua diferenciação. No entanto, a perda progressiva da totipotência resulta em filotaxia anormal e múltiplas brotações, culminando na diminuição da proliferação axilar, necrose foliar e apical, baixa capacidade de enraizamento e ramos translúcidos e esfaceláveis (Gaspar et al., 2000).

Em concentrações superiores a 1 μ M de BAP, o porta-enxerto de videira “420-A” diferenciou menor número de folhas, havendo comprometimento tanto do desenvolvimento quanto da qualidade das brotações, em decorrência da hiperidricidade (Dzazio et al., 2002). Analisando as estruturas de folhas hiperídricas do porta-enxerto de videira ‘VR043-43’, Barbosa (2006) observou que as células-guarda eram anormais; maiores e mais arredondadas comparadas às folhas não hiperídricas. Os estômatos eram dispostos acima do nível das demais células da epiderme, sem cristas cuticulares e a parede celular da célula-guarda era protraída ao redor do poro estomático. Ocorreu pouca delimitação entre os parênquimas paliçádico e lacunoso, com células arredondadas e hipertrofiadas. Houve aparente incremento na largura da lâmina foliar e redução da expansão foliar.

Dessa forma, este trabalho objetivou determinar a influência da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na ocorrência de hiperidricidade no porta-enxerto de videira VR043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultivo do material vegetal em meio indutor de hiperidricidade

Segmentos nodais do porta-enxerto de videira VR043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*), contendo uma folha, foram inoculados em frascos de vidro (267 ± 5 mL de capacidade) contendo 40 mL de meio de cultura, composto por sais MS $\frac{1}{2}$ força (Murashige & Skoog, 1962) modificado; 330 mg L^{-1} de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 75% de micronutrientes, 100% complexo vitamínico MS, suplementado com 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 30 g L^{-1} sacarose, solidificado com $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de Phytigel[®] (Sigma Chemical Company, EUA), pH $5,8 \pm 0,2$, autoclavado a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos. O meio foi suplementado ou não com 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de $4,44 \text{ } \mu\text{M}$ ou $8,88 \text{ } \mu\text{M}$.

Os frascos foram vedados com tampa de polipropileno e mantidos em sala de crescimento a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 16 horas, em irradiância de $40 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por 45 dias.

2.2. Análise estrutural

Folhas totalmente expandidas, do segundo nó basípeto, foram coletadas após 45 dias de cultivo e fixadas em FAA₅₀ [formaldeído: ácido acético: etanol (3:1:1)] (Johansen, 1940) para análise estrutural, ou cortadas a fresco em micrótomo de mesa, para análise histoquímica. O material fixado, posteriormente, foi desidratado em série etílica, emblocado em historresina (Leica[®]) e cortado a $6 \text{ } \mu\text{m}$ de espessura, em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155, Leica), com navalha de vidro. Os cortes foram corados em azul de toluidina para análise estrutural, ou submetidos à floroglucina ácida e lugol para determinação de lignina e amido, respectivamente (Johanson, 1940). As lâminas permanentes foram montadas em resina sintética Permout[®], e as temporárias em água glicerizada. As observações foram realizadas em fotomicroscópio (modelo AX70TRF, Olympus, Japão) equipado com sistema U-photo (Olympus, Japão) do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

2.3. Digestão nitroperclórica do material vegetal

Aproximadamente 100 mg de massa seca da parte aérea, obtidos aos 45 dias de cultivo, foram digeridos em 4 mL de mistura nitroperclórica (3:1), após pré-digestão de aproximadamente 8 horas, pela elevação gradual da temperatura até 250 °C, o volume do extrato foi completado para 25 mL, depois da passagem por filtro Whatman® n° 3. Então, a solução obtida foi analisada em fotômetro de chama para determinação dos teores de K, e em espectrofotômetro de emissão em plasma de argônio indutivamente acoplado para os demais elementos.

2.4. Delineamento experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4 x 3 [quatro períodos de coleta e três concentrações de BAP (0; 4,44 e 8,88 µM)], contendo cinco repetições, sendo cada unidade experimental constituída por um frasco com quatro explantes.

Para determinação de massa fresca, seca e teores de macro e micronutrientes da parte aérea, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 3 concentrações de BAP (0; 4,44 µM e 8,88 µM) e cinco repetições. Cada unidade experimental constituiu um frasco contendo quatro segmentos nodais.

O material vegetal, obtido aos 45 dias de cultivo, foi desidratado em estufa, com ventilação forçada a 60 °C até atingir peso constante, e posteriormente digerido, para determinação dos teores de macro e micronutrientes na parte aérea.

3. RESULTADOS

3.1. Crescimento e desenvolvimento

Explantos cultivados nos meios com regulador apresentaram características de hiperidricidade de forma heterogênea, dentro e entre as unidades experimentais, ao longo do período de experimentação. Aos 7 dias de cultivo, foram observadas brotações com aspecto hiperídrico, em meio com 4,44 μM de BAP. No meio com 8,88 μM de BAP todos os explantes apresentaram brotações com até 2 gemas, enquanto em meio sem regulador (MS0) não houve evidências de organogênese.

Aos 15 dias de cultivo, brotações e primórdios radiculares foram evidentes, em meio MS0. Pelo menos 25% dos explantes, no tratamento com 4,44 μM BAP, apresentaram calejamento na base, com até dois ramos compostos por 1 a 4 gemas, com caracteres hiperídricos. Os demais explantes apresentaram entrenós curtos e folhas pouco expandidas, de coloração mais clara e margem denteada proeminente.

Nos frascos com 8,88 μM de BAP, 100% dos explantes apresentaram brotações e calejamento aos 15 dias de cultivo, com sintomas de hiperidricidade em aproximadamente 25% destes. Os explantes hiperídricos apresentaram de 2 a 4 ramos, com 1 a 3 gemas, folhas cloróticas e ocasional necrose do ápice. As plantas não hiperídricas eram compostas por apenas um ramo, com 1 a 4 gemas, entrenós curtos e folhas menores com margem denteada proeminente.

Aos 21 dias de cultivo, aproximadamente 80% das plantas nos meios contendo citocinina apresentavam características de hiperidricidade. Aos 28 dias, esse percentual aumentou para 84% e 92% nos meios com 4,44 e 8,88 μM de BAP, respectivamente. Aos 35 dias, houve hiperidricidade em aproximadamente 63% das plantas em meio com 4,44 μM de BAP, porém não houve constatação de plantas hiperídricas na maior concentração de citocinina (Tabela 1).

Aos 45 dias de cultivo, a porcentagem de plantas hiperídricas, determinada pela quantificação de plantas com características de hiperidricidade, foi de 0% e 100% nos meios com 4,44 μM e 8,88 μM de BAP, respectivamente (Tabela 1). Em meio MS0 a parte aérea e o sistema radicular desenvolveram normalmente, com expansão da área foliar e alongamento do entrenó (Figuras 1A e 2A), enquanto em meio com regulador o número de gemas e ramos foi maior nas duas concentrações testadas (Figuras 1B e 1C).



Figura 1: Plantas do porta-enxerto de videira VR043-43, regeneradas a partir de explantes nodais, em meios MS0 (A), MS suplementado com 4,44 μM (B) e com 8,88 μM (C) de BAP, aos 45 dias de cultivo. Barras = 1 cm em A; 0,5 cm em B e C.

Tabela 1: Porcentagem de hiperidricidade nos frascos de cultivo do porta-enxerto de videira VR043-43, contendo os meios MS0 e MS suplementado com 4,44 μM , com 8,88 μM de BAP, aos 21, 28, 35 e 45 dias após a inoculação

Meio de cultura	Tempo (dias)			
	21	28	35	45
MS 0	0,0 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)
4,44 μM BAP	80,0 ($\pm 11,18$)	83,3 ($\pm 10,21$)	62,5 ($\pm 12,5$)	0,00 ($\pm 0,00$)
8,88 μM BAP	90,0 ($\pm 13,69$)	91,7 ($\pm 10,21$)	0,0 (0,00)	100,0 ($\pm 0,00$)

\pm . Desvios-padrões das médias.

As plantas hiperídricas desenvolveram caule com maior diâmetro, com entrenós mais curtos, de aspecto translúcido e calejamento na base. As folhas expandiram pouco e apresentaram encarquilhamento, turgidez e translucidez, e margens denteadas proeminentes (Figuras 1B, 1C, 2B e 2C). O número de ramos, gemas e folhas foi maior na concentração de 8,88 μM de BAP, onde ocorreu necrose do ápice da parte aérea em algumas plantas (Figura 2C).

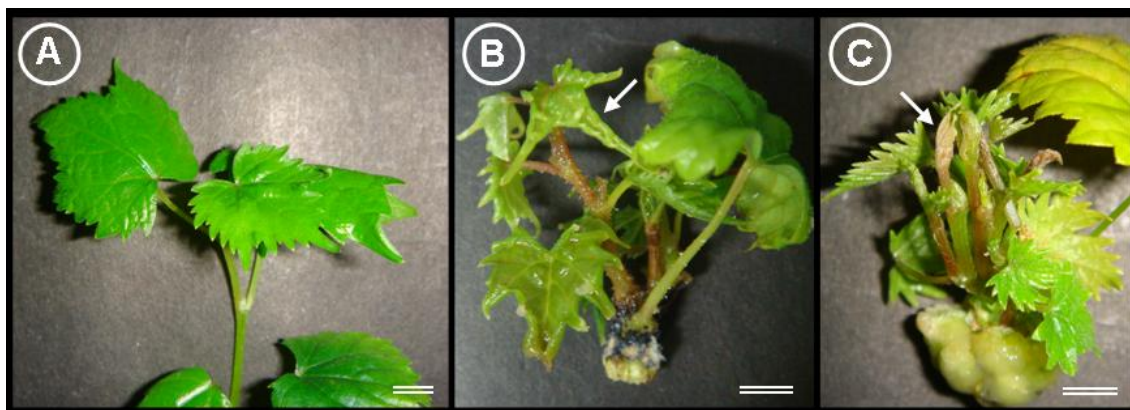


Figura 2: Detalhe das plantas regeneradas, do porta-enxerto de videira VR043-43, em meios MS0 (A), MS suplementado com 4,44 μM (B) e com 8,88 μM (C) de BAP, aos 45 dias de cultivo. Setas indicam encarquilhamento das folhas em B e necrose do ápice em C. Barras = 0,5 cm.

A massa fresca das folhas aos 45 dias de cultivo tendeu a aumentar em meio com regulador (Figura 3A). A massa fresca do caule tendeu a aumento em meio suplementado com 8,88 μM de BAP (Figura 3A). A massa fresca dos calos foi maior no meio com 4,44 μM de BAP, sendo os menores valores encontrados para o sistema radicular no meio MS0 (Figura 3A). A massa seca das folhas e do caule aumentou com a concentração de citocinina, e a massa seca do sistema radicular foi menor comparada a dos calos, os quais tiveram maior massa em meio com 4,44 μM de BAP (Figura 3B).

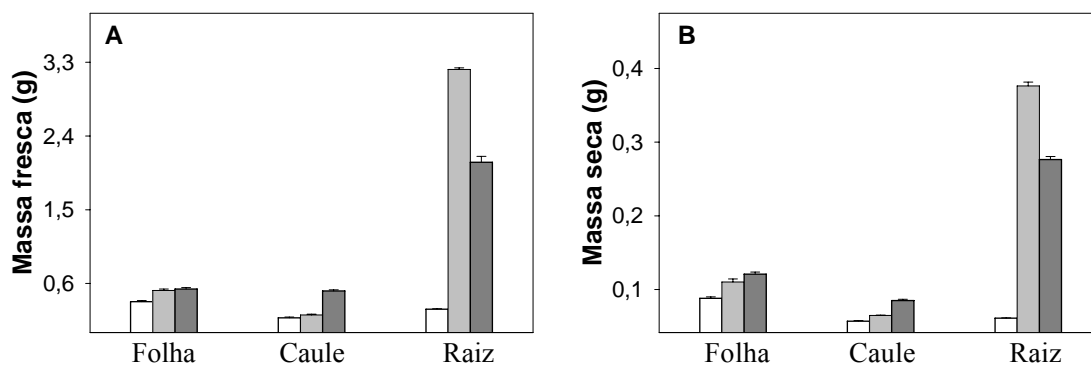


Figura 3: Médias da massa fresca e da massa seca (g) das folhas, caule e raiz/ calo, do porta-enxerto de videira VR043-43, em meios MS0 (□), MS suplementado com 4,44 μM (▤) e com 8,88 μM (■) de BAP, aos 45 dias de cultivo. As barras representam o erro padrão da média.

As massas fresca e seca da parte aérea, aos 45 dias de cultivo, aumentaram com a concentração de citocinina, enquanto as massas fresca e seca dos calos e a massa total foram maiores nos meios com regulador, principalmente na concentração de 4,44 μM de BAP (Figura 4).

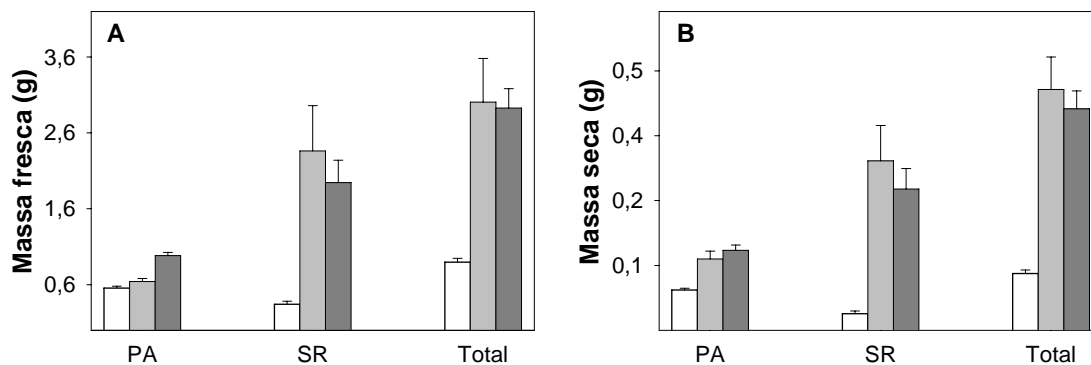


Figura 4: Médias da massa fresca (g) e da massa seca da parte aérea (PA), do sistema radicular/ calo (SR) e total, do porta-enxerto de videira VR043-43, em meios MS0 (□), MS suplementado com 4,44 μM (▤) e com 8,88 μM (■) de BAP, aos 45 dias de cultivo. As barras representam o erro padrão da média.

3.2. Análise estrutural

3.2.1. Estudo anatômico

Em folhas não hiperídricas observou-se parênquima paliçádico definido e uniestratificado ocupando cerca de metade do mesofilo, e parênquima lacunoso variando de duas a três camadas de células, com reduzidos espaços intercelulares (Figuras 5A e B).

Não houve diferenciação do parênquima clorofiliano em paliçádico e lacunoso em meio com regulador, visto que suas células não exibiram formato e organização típicos. As células parenquimáticas apresentaram-se desuniformes (Figuras 5D e 5F), quando comparadas à de folhas em meio sem regulador (Figura 5D). Tais modificações foram mais evidentes na maior concentração de BAP (Figura 5F), além da observação de células mais adensadas e menos espaços intercelulares. Observou-se, ainda, que as células parenquimáticas da nervura mediana aparentavam maior volume e parênquima desorganizado no limbo, comparado ao observado em folhas cultivadas sem regulador (Figuras 5A, C e E).

Houve incremento no conteúdo de coloração esverdeada, na região da lâmina foliar, com o aumento da concentração de BAP (Figuras 5A, 5C e 5E).

Os estômatos das folhas, em meio com regulador, foram mal formados, contendo células-guarda atípicas, projetadas acima das demais células da epiderme (Figuras 5D, 5E e 5F), apresentando irregularidade na organização celular da epiderme da face abaxial da folha em meio com 8,88 μM de BAP (Figura 5F).

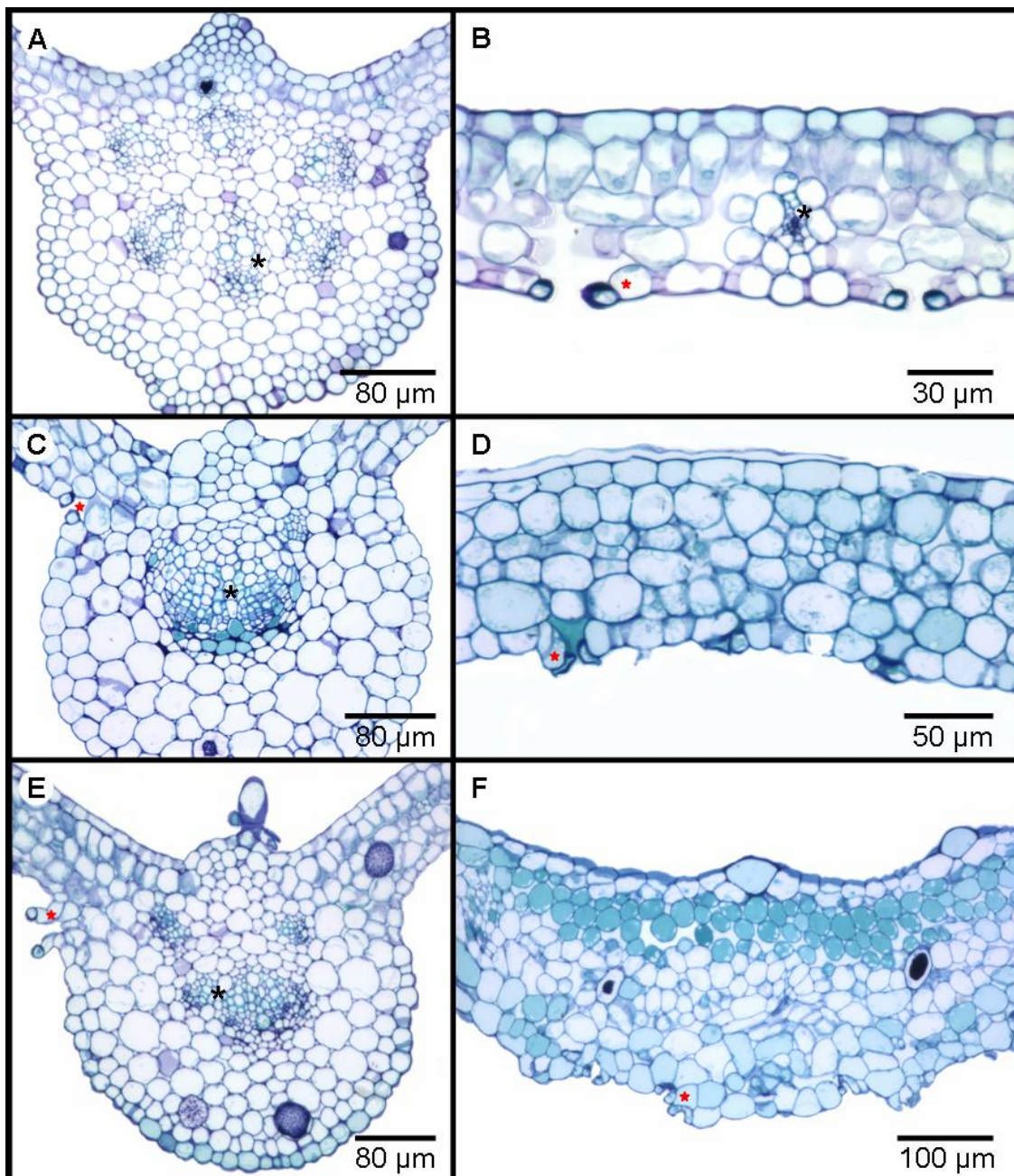


Figura 5: Corte transversal de folhas, do porta-enxerto VR043-43, obtidas em meios MS0 (A e B); MS suplementado com 4,44 μM (C e D) e com 8,88 μM BAP (E e F); as estrelas indicam estômatos, e asteriscos os feixes vasculares.

3.2.2. Histoquímica

Observou-se que a lignificação dos feixes vasculares das folhas do porta-enxerto de videira foi gradual de acordo com o aumento na concentração do BAP. O teste com floroglucina ácida foi positivo nas células de condução do xilema,

principalmente nas folhas formadas em meio com 8,88 μM de BAP (Figuras 6A, 6C e 6E).

Pelo teste com lugol nas folhas oriundas do cultivo nos meios MS0 (Figura 6B) e MS suplementados com BAP (Figuras 6D e 6F) observou-se que não houve diferença quanto ao acúmulo de amido entre os tratamentos.

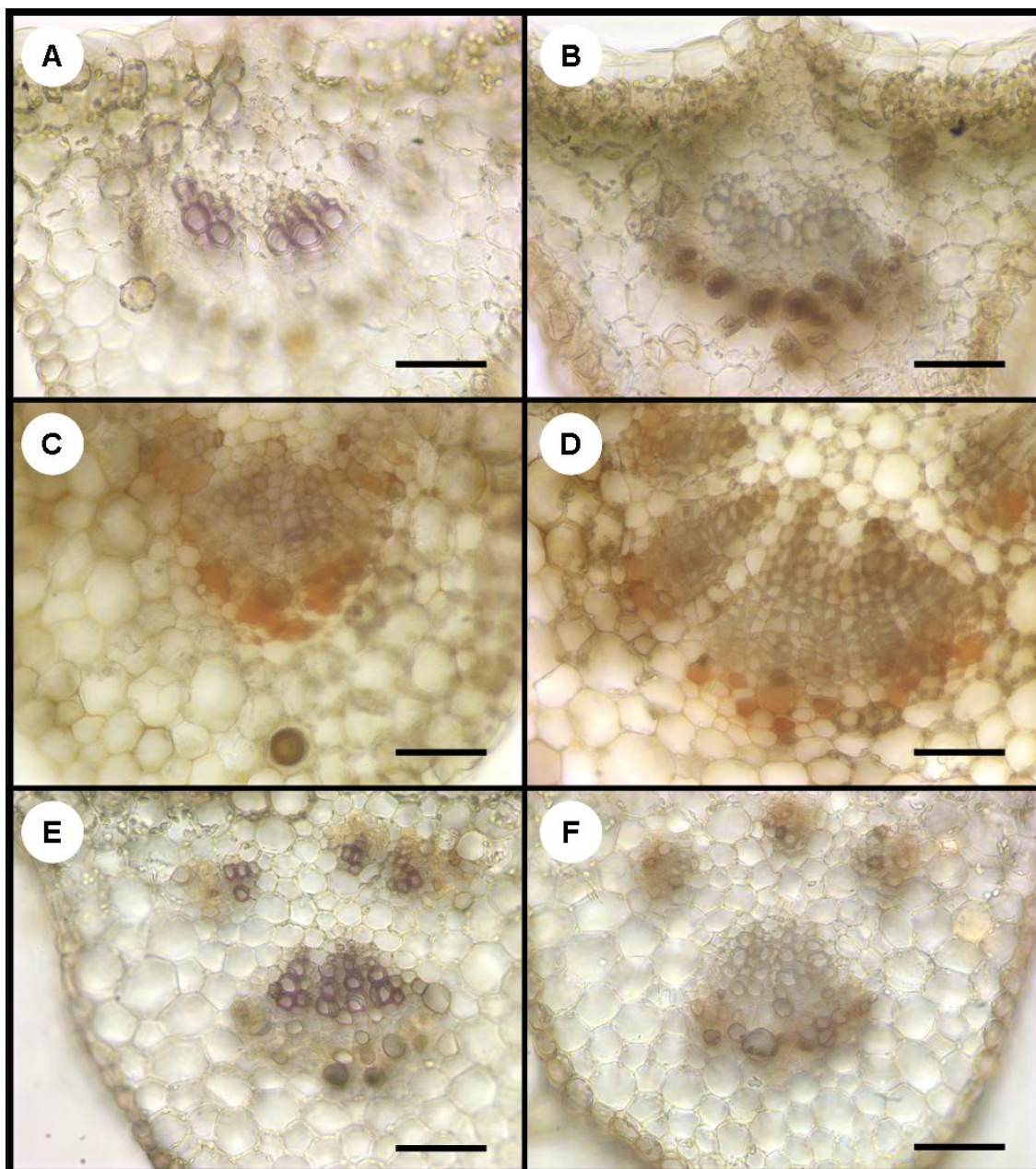


Figura 6: Corte transversal de folhas, do porta-enxerto de videira VR043-43, obtidas em meios MS0 (A e B), MS suplementado com 4,44 μM (C e D) e com 8,88 μM de BAP (E e F). À esquerda (A, C e E), reação com floroglucina ácida, e à direita (B, D e F) com lugol. Barra = 50 μm .

3.3. Teores de macro e micronutrientes da parte aérea

Os teores de macro e micronutrientes na parte aérea das plantas obtidas, aos 45 dias de cultivo, foram maiores em meio MS0 (Figuras 7 e 8). As concentrações de cálcio, magnésio, enxofre e ferro (Figuras 7C, D, E e F) não diferiram entre os meios suplementados com BAP (4,44 e 8,88 μM). Os teores de fósforo, potássio e zinco foram maiores na concentração de 8,88 μM , entre os meios com regulador (Figuras 7A, B e G). No entanto, analisando o cobre e o manganês, a relação foi inversa (Figuras 8 e 7H, respectivamente).

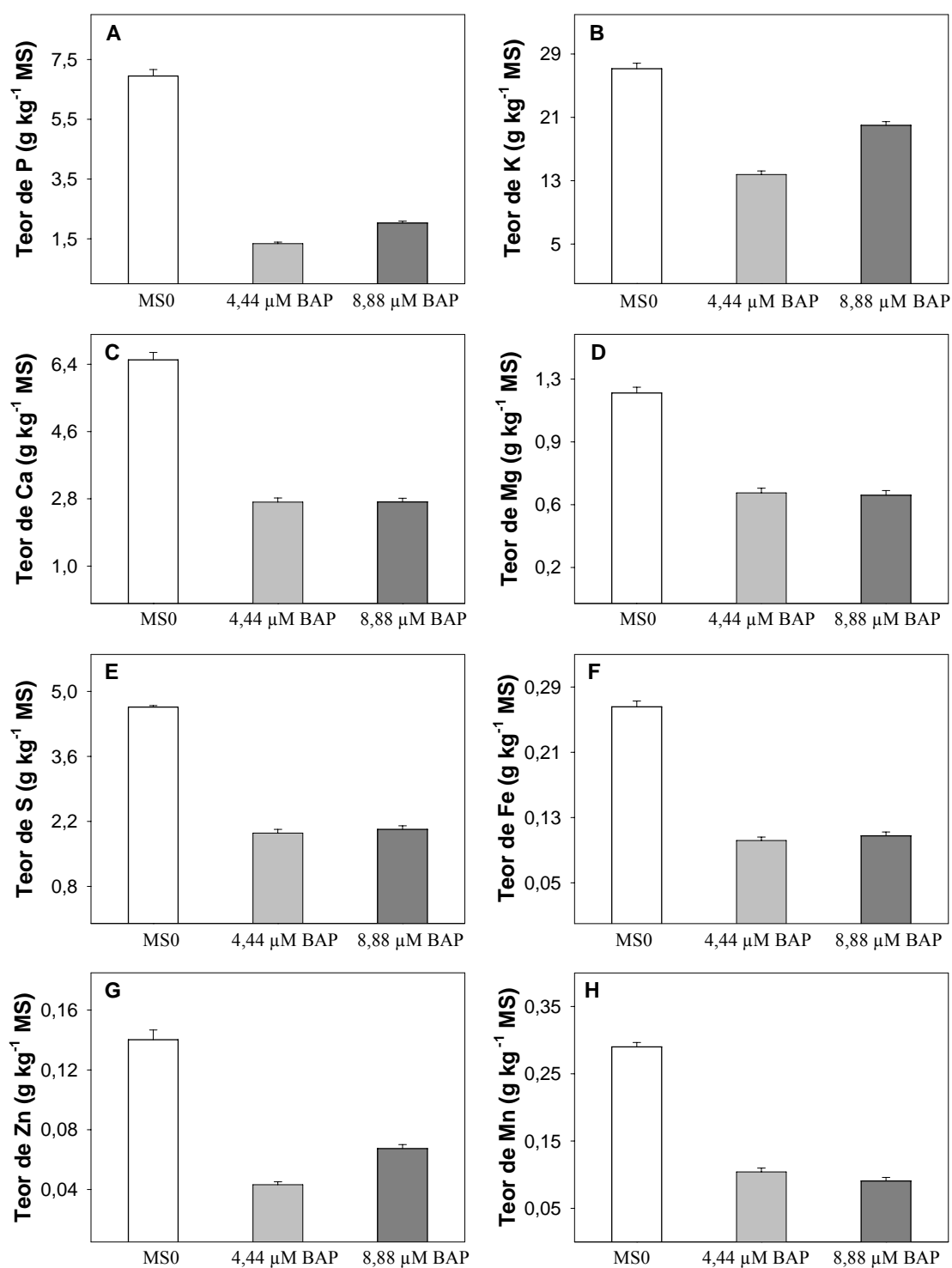


Figura 7: Médias dos teores de macro e micronutrientes (g kg^{-1} MS), da parte aérea do porta-enxerto de videira VR043-43, em meios MS0 (\square), MS suplementado com 4,44 μM (\square) e com 8,88 μM (\blacksquare) de BAP, aos 45 dias de cultivo. As barras representam o erro padrão da média.

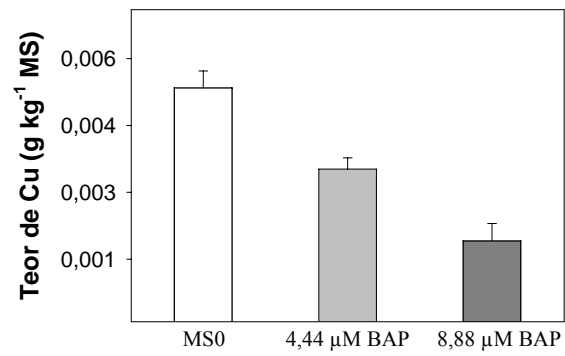


Figura 8: Médias dos teores de Cu (g kg^{-1} MS), na parte aérea do porta-enxerto de videira VR043-43, em meios MS0 (\square), MS suplementado com $4,44 \mu\text{M}$ (\square) e com $8,88 \mu\text{M}$ (\blacksquare) de BAP, aos 45 dias de cultivo. As barras representam o erro padrão da média.

4. DISCUSSÃO

4.1. Crescimento e desenvolvimento

A indução de múltiplas brotações em meio contendo regulador (Figura 1) e os sintomas de hiperidricidade evidenciados em videira corroboraram com resultados de trabalho com açafrao (Mandal & Gupta, 2001) e em eucalipto (Whitehouse et al., 2002).

Plantas hiperídricas desenvolveram entrenós curtos, folhas mal formadas, de aspecto túrgido ou translúcido; pouco expandidas, com múltiplas brotações pouco alongadas, assim como observado em jobba (Apóstolo & Llorente, 2000) e em videira (Machado et al., 2006). Tais características foram associadas ainda a necrose do ápice caulinar neste trabalho, na maior concentração de citocinina, indicando comprometimento do meristema apical e da nutrição (Figuras 2B e C).

As brotações desenvolvidas, a partir de explantes em meio contendo BAP, apresentaram sintomas de hiperidricidade, os quais se acentuaram com o aumento da concentração de citocinina (Figura 1), porém de forma heterogênea, o que é explicado pela aleatoriedade da ocorrência deste fenômeno.

Enquanto o uso de citocinina estimula maior produção de parte aérea, o excesso é tóxico e compromete o desenvolvimento das culturas. A toxidez por citocinina no meio se caracteriza, principalmente, pelo excessivo entumescimento e falta de alongamento das culturas e redução no tamanho das folhas. Outros sintomas são encurtamento dos entrenós, engrossamento excessivo dos caules e hiperidricidade generalizada, com conseqüente dificuldade na etapa de enraizamento (Leshem et al., 1988). Estes autores relacionaram o processo de hiperidricidade em culturas de crisântemo e melão com toxidez de BAP.

O BAP induziu calogênese durante o cultivo de videira, sendo mais pronunciada na menor concentração (Figura 1C). Resultados distintos foram observados em lisianto, onde elevadas concentrações de BAP induziram maior proliferação de calo (Paek & Hahn, 2000). A formação de calos na base dos explantes, com inibição total do enraizamento, em meio com BAP, já haviam sido relatados para o porta-enxerto VR043-43 por Machado (2006) e Barbosa (2006).

Em meio com citocinina constatou-se incremento da massa fresca e da massa seca das folhas e do caule de videira, aumentando concomitante à concentração de

BAP, e maior massa para os calos formados, em detrimento do sistema radicular desenvolvido em meio MS0 (Figura 3). Segundo Zobayed et al. (2001) os maiores valores de massa fresca podem resultar da indução do espessamento dos ramos pelo etileno.

O aumento das concentrações de BAP promoveu menor comprimento dos brotos e aumento da massa fresca da parte aérea neste trabalho, corroborando com trabalho desenvolvido em amoreira (Villa et al., 2005). Houve incremento de massa seca e indução de hiperidricidade, assim como descrito por outros autores em videira (Barbosa, 2006; Santos, 2007).

As massas fresca e seca da parte aérea, do sistema radicular e total, em videira, foram maiores em meio com citocinina, sendo que na maior concentração as massas da parte aérea foram maiores, enquanto a dos calos foi maior na menor concentração de BAP (Figura 4). Este dado evidencia que em meio com 4,44 μM de BAP houve maior indução de calogênese, enquanto em meio com 8,88 μM de BAP o estímulo para formação e desenvolvimento de ramos foi acentuado.

Ao contrário dos resultados observados em videira, explantes foliares de tabaco em meio com BAP não apresentaram sintomas de hiperidricidade, porém a massa seca das plantas regeneradas foi maior em meio sem o regulador, o que indicaria maior conteúdo de água em explantes cultivados com essa citocinina (Ramage & Williams, 2004).

4.2. Análise estrutural

4.2.1. Estudo anatômico

A organização estrutural das folhas desenvolvidas em meio sem regulador (Figuras 5A e B) corroborou com os resultados obtidos em videira (Barbosa, 2006; Machado, 2006; Santos, 2007). No entanto, BAP induziu a formação de folhas com mesofilo pouco organizado, no qual não foi possível diferenciar os parênquimas paliçádico e lacunoso (Figuras 5D e F). A epiderme das folhas desenvolvidas, em meio com 8,88 μM de BAP, apresentou-se irregular, e aparentemente com grande número de estômatos (Figura 5F). Corroborando com o observado neste trabalho (Figuras 5D e 5F), estômatos de folhas hiperidratadas de cravo apresentaram células-

guarda situadas tanto em nível das demais células epidérmicas (Olmos & Hellín, 1998) quanto acima destas (Majada et al., 2001).

Como a epiderme é o tecido mais externo dos órgãos vegetais e está em contato com o ambiente, fica sujeita às modificações estruturais decorrentes de estresses ambientais em que as plantas se encontram (Santos, 2007).

Alterações estruturais, como malformação dos estômatos e desorganização do mesofilo também foram relatadas por Barbosa (2006) e Santos (2007), em videira no cultivo com BAP, e em damasco (Pérez-Tornero et al., 2001), onde o acúmulo excessivo de água levou aos sintomas observados em folhas hiperídricas.

O aspecto suculento das folhas hiperídricas de jojoba obtidas em meio com BAP resultou do aumento do tamanho das células do mesofilo e dos abundantes espaços intercelulares. Os estômatos estavam no nível das demais células da epiderme, com células-guarda grandes e anormais, malformadas e não funcionais, com pequenos poros associados, indicando descontinuidade da epiderme (Apóstolo & Llorente, 2000).

A organização estrutural das folhas não hiperídricas observadas neste trabalho (Figuras 5A e B) corroboraram com os resultados obtidos em videira em trabalhos anteriores (Barbosa, 2006; Machado, 2006; Santos, 2007).

Observou-se maior conteúdo de coloração esverdeada na região do feixe vascular em folhas de plantas cultivadas em meio com BAP, o que poderia se tratar de compostos fenólicos (Figura 5F). Transgênicos de tabaco superprodutores de citocininas em resposta a estresse apresentaram maior conteúdo de compostos fenólicos na região da nervura mediana em relação ao controle (Schnablová et al, 2006), indicando o envolvimento e possível efeito direto destes reguladores na produção de tais compostos.

Testes histoquímicos específicos para detecção de compostos fenólicos são necessários para determinação deste componente esverdeado evidenciado pela coloração com azul de toluidina.

4.2.2. Histoquímica

As citocininas, em níveis adequados, aumentam a sensibilidade do câmbio vascular ao estímulo das auxinas, resultando em maior taxa de formação de

floema/xilema; estudos de plantas transgênicas com níveis alterados de citocinina confirmam seu envolvimento na diferenciação vascular, influenciando a diferenciação celular nos tecidos vasculares, o que varia de acordo com seus níveis fisiológicos e com os de auxina (Aloni, 1993).

O desenvolvimento foliar e a diferenciação dos tecidos ao longo do eixo da planta são afetados por gradientes fisiológicos induzidos por sinais móveis, como as auxinas e as citocininas, os quais podem promover alterações graduais no desenvolvimento dos órgãos e diferenciação de tecidos (Aloni, 2001). Tais constatações explicariam as alterações observadas quanto à lignificação dos vasos com a utilização de BAP no meio de cultivo (Figuras 6A, C e E).

A não diferenciação no acúmulo de amido entre os tratamentos neste trabalho (Figuras 6B, D e F) contrasta com os resultados encontrados por Oliveira et al. (2008), onde análises estruturais demonstraram que plantas de *Annona glabra* cultivadas com BAP e cinetina possuíam cloroplastos com maior acúmulo de grãos de amido.

Os cloroplastos do parênquima paliçádico das plantas hiperídricas de damasco estocaram grande quantidade de amido, com desorganização dos tilacóides (Pérez-Tornero et al., 2001), bem como naqueles de macieiras hiperídricas (Chakrabarty et al., 2005). O acúmulo de amido nos cloroplastos de plantas hiperídricas de pimentão foi maior do que nas não hiperídricas. Este resultado pode refletir um atraso na mobilização de açúcares, ocasionado por mudanças na permeabilidade das membranas, comprometendo a partição dos fotoassimilados e culminando no acúmulo de amido no local de síntese. Tal hipótese foi reforçada pela anormalidade dos cloroplastos de folhas hiperídricas em relação à organização dos tilacóides em pimentão (Fontes et al., 1999).

Neste trabalho, contudo, a limitação da expansão foliar imposta pelo BAP possivelmente comprometeu o processo fotossintético, e, conseqüentemente, a produção e acúmulo de amido na espécie estudada. A indução de múltiplas brotações em meio com esta citocinina provavelmente exigiu maior consumo de carbono, o que é evidenciado pelo maior ganho de massa seca, desfavorecendo o acúmulo de amido.

4.3. Teores de macro e micronutrientes da parte aérea

A diferença nos teores de nutrientes entre os tratamentos (Figuras 7 e 8) possivelmente resultou do comprometimento da absorção destes através da barreira mecânica imposta pelos calos formados na base dos explantes em meio com citocinina. Concordando com esta hipótese, os resultados demonstraram que na menor concentração de regulador, na qual a calogênese foi expressiva, os níveis da maioria dos nutrientes foram menores que em meio contendo 8,88 μM de BAP (Figuras 7 e 8).

O comprometimento do crescimento e as alterações morfológicas dos explantes, cultivados em altas concentrações de BAP, parecem não decorrer de deficiências minerais. Apesar da diferença no conteúdo de macronutrientes, os níveis encontrados não foram considerados tóxicos ou característicos de deficiência (Figuras 7 e 8). Tais respostas na absorção mineral poderiam resultar do efeito indireto de altos níveis de BAP, independentemente do papel desta citocinina na organogênese (Ramage & Williams, 2004). A necrose dos ápices foliares observados na maior concentração de citocinina (Figura 2C) possivelmente resultou da toxicidade desse regulador.

5. CONCLUSÕES

O BAP promoveu alterações na morfologia das plantas de videira, como múltiplas brotações e calejamento na base dos explantes, culminando na ocorrência de hiperidricidade.

Houve alteração na organização estrutural das folhas em cultivo com BAP, visto que o mesofilo apresentou desorganização das células do parênquima clorofiliano, além de alteração na disposição e abertura das células-guarda, com estômatos dispostos acima do nível das demais células epidérmicas. Observou-se também maior volume das células do parênquima fundamental na nervura mediana, culminando em maior espessura da lâmina foliar.

As folhas desenvolvidas em meio contendo BAP não diferiram do controle quanto ao conteúdo amido, no entanto, houve maior lignificação nos feixes vasculares e maior conteúdo esverdeado corado com azul de toluidina concomitante ao aumento na concentração desta citocinina. Trabalhos futuros para definição da natureza química deste conteúdo são necessários.

A calogênese promovida pelo BAP resultou em menor absorção de nutrientes nos ramos formados, agindo como barreira mecânica à absorção de nutrientes e, conseqüentemente, comprometendo a nutrição da parte aérea.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONI, R. The role of cytokinin in organized differentiation of vascular tissues. *Australian Journal of Plant Physiology*, 20:601 – 608, 1993.

ALONI, R. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: hypotheses and evidence. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20:22–34, 2001.

APÓSTOLO, N. M.; LLORENTE, B. E. Anatomy of normal and hyperhydric leaves and shoots of in vitro grown *Simmondsia chinensis* (Link) Schn. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 36:243-249, 2000.

BARBOSA, L.M.P. *Caracterização anatômica e bioquímica da hiperhidricidade em morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) e videira (*Vitis vinifera x Vitis rotundifolia*) propagados in vitro*. Viçosa: UFV, 2006. 128 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

CHAKRABARTY, D.; PARK, S.Y.; ALI, M.B.; SHIN, K. S.; PAEK, K. Y. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiology*, 26: 377-388, 2005.

DZAZIO, P. M.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira ‘420-A’. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24:759-764, 2002.

FONTES, M. A.; OTONI, W. C.; CAROLINO, S.M.B.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; FONTES, E.P.B.; FÁRI, M.G.; LOURO, R.P. Hyperhydricity in pepper plants regenerated in vitro: involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. *Plant Cell Reports*, 19:81–87, 1999.

FRANCK, T.; KEVERS, C.; GASPAR, T.; DOMMES, J.; DEBY, C.; GREIMERS, R.; SERTEYN, D.; DEBY-DUPONT, G. Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42:519–527, 2004.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; BISBIS, B.; FRANCK, T. Special Symposium: *in vitro* plant recalcitrance loss of plant organogenic totipotency in the course of *in vitro* neoplastic progression. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 36:171–181, 2000.

JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1940. 423p.

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77: 181-191, 2004.

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

MACHADO, M. P. *Micropropagação do porta-enxerto de videira 'VR043-43' (Vitis vinifera L. x Vitis rotundifolia Michx.)*. Curitiba: UFPR, 2006. 83 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, 2006.

MAJADA, J. P.; SIERRA, M. I.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. Air exchange rate affects the *in vitro* developed leaf cuticle of carnation. *Scientia Horticulturae*, 87:121-130, 2001.

MANDAL, A. K. A.; GUPTA, S. D. Direct shoot organogenesis and plant regeneration in safflower. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37:50-54, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497, 1962.

OLIVEIRA, L. M. DE; PAIVA, R.; SANTANA, J. R. F. DE.; ALVES, E.; NOGUEIRA, R. C.; PEREIRA, F. D. Effect of cytokinins on *in vitro* development of

autotrophism and acclimatization of *Annona glabra*. L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 44:128–135, 2008.

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

PAEK, K-Y.; HAHN, E-J. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 36:128–132, 2000.

PARK, S. W.; JEON, J. H.; KIM, H. S.; PARK, Y. M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 99:199–205, 2004.

PÉREZ-TORNERO, O.; EGEA, J.; OLMOS, E.; BURGOS, L. Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37:250-254, 2001.

PICOLI, E.A.T.; OTONI, W.C.; FIGUEIRA, M.L.; CAROLINO, S.M.B.; ALMEIDA, R.S.; SILVA, E.A.M.; CARVALHO, C.R.; FONTES, E.P.B. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). *Plant Science*, 160: 857-868, 2001.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 38:116–124, 2002.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Cytokinin-induced abnormal shoot organogenesis is associated with elevated Knotted1-type homeobox gene expression in tobacco. *Plant Cell Reports*, 22:919–924, 2004.

REYES-VERA, I.; POTENZA, C.; BARROW, J. Hyperhydricity reversal and clonal propagation of four-wing saltbush (*Atriplex canescens*, Chenopodiaceae) cultivated *in vitro*. *Australian Journal of Botany*, 56:358–362, 2008.

SAHER, S.; PIQUERAS, A.; HELLIN, E.; OLMOS, E. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 120:152-161, 2004.

SANTOS, R. P. *Respostas morfofisiológicas de videiras cultivadas sob diferentes condições in vitro*. Viçosa: UFV, 2006. 109p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, 2007.

SCHNABLOVÁ, R.; SYNKOVÁ, H.; VIČÁNKOVÁ, A.; BURKETOVÁ, L.; EDER, J.; CVIKROVÁ, M. Transgenic *ipt* tobacco overproducing cytokinins overaccumulates phenolic compounds during in vitro growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44:526-534, 2006.

VILLA, F.; ARAÚJO, A. G.; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. *Ciência e Agrotecnologia*, 29:582-589, 2005.

WHITEHOUSE, A. B.; MARKS, T. R.; EDWARDS, G. A. Control of hyperhydricity in *Eucalyptus* axillary shoot cultures grown in liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71:245–252, 2002.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh, P.C.; Zimmerman, R.H. (Eds.) *Micropropagation: Technology and Applications*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.45–69.

ZIV, M. *In vitro* acclimatization. In: Aitken-Christie, J.; Kozai, T.; Smith, M.A.L. (Eds.) *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1995, p.493-516.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Micropropagation of potato: evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization. *Annals of Botany*, 87:53-59, 2001.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que:

- O BAP promoveu a formação de primórdios foliares, gemas, ramos e calos na base dos explantes e o decréscimo das massas fresca e seca dos ramos, porém inibe o alongamento dos entrenós, a rizogênese e a expansão foliar;
- Os calos formados em meio suplementado com BAP alteraram a absorção e translocação de nutrientes para a parte aérea das plantas, influenciando a morfologia e o desenvolvimento dos ramos;
- A calogênese induzida pelo BAP promoveu alteração das taxas respiratórias, modificando a dinâmica entre o consumo e produção de CO₂ e O₂ nos frascos de cultivo;
- Houve indução de hiperidricidade pelo BAP, evidenciada pelo espessamento e encarquilhamento das folhas (translúcidas e mais claras); espessamento do caule e entrenós curtos, ocorrência de necrose do ápice, com aumento das massas fresca e seca;
- O BAP promoveu alterações estruturais das folhas, aumentando o volume das células do parênquima fundamental na nervura mediana e desorganização do mesofilo, além de alteração na forma e disposição das células-guarda.