PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DA VITRIFICAÇÃO E DO
DESENVOLVIMENTO DO CRAVO (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*.

GERALDO ROGÉRIO FAUSTINI CUZZUOL
Biólogo

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de
Concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto - 1993

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

C993p Cuzzuol, Geraldo Rogério Faustini
Parâmetros bioquímicos e fisiológicos da vitrificação e do desenvolvimento do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. Piracicaba, 1993.
89p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Biotecnologia agrícola 2. Cravo - Enraizamento *in vitro* 3. Cravo - Produção 4. Cravo - Propagação *in vitro* 5. Cravo - Regulador de crescimento - Efeito
I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 635.933152

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DA VITRIFICAÇÃO E DO
DESENVOLVIMENTO DO CRAVO (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*.

GERALDO ROGÉRIO FAUSTINI CUZZUOL

Aprovado em: 05.11.1993

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo ESALQ/USP

Prof. Dr. Antônio Augusto Lucchesi ESALQ/USP

Prof. Dr. Celso Rossi UNESP/BOTUCATU

Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO
Orientador

"Mas onde se achará sabedoria?
e onde está o lugar do entendimento?
O homem não conhece o valor dela,
nem se acha ela na terra dos vivos.
O abismo diz: Ela não está em mim; e o mar diz:
Não está comigo...
Donde, pois, vem a sabedoria,
e onde está o lugar do entendimento?...
E disse Deus ao homem: Eis que o temor do Senhor é a
sabedoria, e o apartar-se do mal é o entendimento."

Jó 28: 12-28

Ao Grande Deus, minha gratidão

Aos meus familiares
e amigos,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho só foi possível graças à imprescindível colaboração de: Prof. Marcílio de Almeida, Prof. Luiz Antônio Gallo, Prof. Murilo de Melo, Prof^a Maria Cristina Stolf Nogueira, Prof^a Clarice Garcia Borges Demetrio, Prof. Luiz Roberto Angelocci, Antônio F. de Campos Amaral, Jociana Brugneroto, Renato Coletti Junior, João Chaddad Júnior, Antônio Augusto Franco Garcia, Luís Sanches Filho, Kátia M. de Andrade Ferraz, Eliana M. G. Sabino, Silvana Marchizelli Gregorio.

Especialmente, agradeço ao Dr. Otto Jesu Crocomo pela orientação, incentivo e liberdade concedida em fazer ciência através desta dissertação.

SUMARIO

	Páginas
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. A Cultura de Cravo	3
2.2. Cultura de Meristemas	5
2.3. Micropropagação	6
2.4. Organogênese	9
2.5. Vitrificação	10
2.5.1. Alterações Anatômicas	10
2.5.2. Reguladores do Crescimento	12
2.5.3. Potencial de Água e Umidade	14
2.5.4. Componentes Inorgânicos	16
2.6. Enraizamento	18
2.7. Aclimação	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Efeito de BAP na Fase 1	24
3.2. Efeito de Agar e Tipos de Vedação na Fase 1	24
3.3. Efeito de "Gelrite" na Fase 1	24
3.4. Efeito de BAP na Fase 2	25
3.5. Efeito de "Gelrite" na Fase 2	25
3.6. Determinação do Potencial de Água	25
3.7. Corte Histológico	26
3.8. Efeito Qualitativo do Gel e Tipos de Vedação na Fase 2	26
3.9. Efeito de Níveis de NH_4NO_3 e CaCl_2 na Fase 2	26
3.10. Determinação de Proteína Total Solúvel .	27

3.11. Extração e Determinação da Atividade da Peroxidase	27
3.12. Efeito de Reguladores no Enraizamento <u>in vitro</u>	28
3.13. Desenvolvimento em Condições <u>ex-vitro</u> ..	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Efeito de BAP	30
4.2. Efeito de "Gelrite"	34
4.3. Estudos Anátomo-Histológico	40
4.4. Efeito de Sistema de Vedação	44
4.5. Efeito de NH_4NO_3 e CaCl_2	49
4.6. Proteína Total Solúvel	51
4.7. Atividade da Peroxidase	54
4.8. Enraizamento <u>in vitro</u>	59
4.9. Desenvolvimento em condições <u>ex-vitro</u> ...	62
4.10. Considerações Finais	66
5. CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema Geral da Micropropagação do Cravo.	8
2	Efeito do BAP na Taxa de Vitrificação da Fase 1.	31
3	Efeito do BAP na Taxa de Vitritrificação da Fase 2.	32
4	Efeito do BAP no Desenvolvimento da Fase 1.	32
5	Efeito do BAP na Taxa de Propagação da Fase 2.	33
6	Efeito do "Gelrite" na Taxa de Vitrificação e do Desenvolvimento da Fase 1.	35
7	Efeito do "Gelrite" na Taxa de Vitrificação da Fase 2.	36
8	Efeito do "Gelrite" na Taxa de Propagação da Fase 2.	37
9	Aspecto Morfológico de Planta Vitrificada (A) e Planta Normal(B).	41
10	Corte Transversal de Caule de Material Vitrificado (A) e Normal (B).	43
11	Efeito de Sistemas de Vedação na Taxa de Vitrificação e no Desenvolvimento da Fase 1.	45
12	Efeito de Sistemas de Vedação na Taxa de Vitrificação da Fase 2.	46

13	Efeito de Sistemas de Vedação na Taxa de Propagação da Fase 2.	47
14	Efeito de NH_4NO_3 (A) e de CaCl_2 (B) na Taxa de Vitrificação da Fase 2.	50
15	Efeito de Doses de NH_4NO_3 (A) e de CaCl_2 (B) no Nível de Proteína da Fase 2	52
16	Glicólise e Ciclo de Krebs.	53
17	Efeito de Doses de NH_4NO_3 (A) e de CaCl_2 (B) na Atividade de Peroxidase.	55
18	Ação da Peroxidase nas Ligações de Proteínas (A) e Fibras de Parede (B).	57
19	Estrutura da Parede Celular.	57
20	Efeito de Reguladores na Produção de Matéria Seca de Raiz (A) e de Parte Aérea (B).	60
21	Efeito de Condições de Enraizamento no Comprimento de Raiz e de Parte Aérea na Aclimação.	63
22	Efeito de Condições de Enraizamento na Produção de Matéria Seca de Raiz e de Parte Aérea na Aclimação.	63
23	Comportamento das Plantas Aclimatadas enraizadas <u>in vitro</u> com AIA (A) <u>in vitro</u> sem regulador (B) e <u>ex-vitro</u> (C).	65
24	Sinópsse dos Eventos Fisiológicos da Vitrificação.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Composição do Meio de Cultura Básico de MURASHIGE e SKOOG (1962).	23
2	Médias das Notas e N ^o de Plantas Vitrificadas da Fase 1 Considerando Diferentes Doses de BAP.	31
3	Médias de Número de Brotações, Comprimento e N ^o de Plantas Vitrificadas da Fase 2 Considerando Diferentes Doses de BAP.	33
4	Médias das Notas e N ^o de Plantas Vitri-ficadas da Fase 1 Considerando Diferen-tes Concentrações de "Gelrite".	35
5	Médias de N ^o de Brotações, Comprimento e N ^o Plantas Vitrificadas da Fase 2 Considerando Diferentes concentrações de "Gelrite".	37
6	Medidas dos Potenciais de Água em Diferentes Concentrações de "Gelrite" e Explantes Foliares e Caulinares.	39
7	Médias das Notas e N ^o de Plantas Vitrificadas da Fase 1 Considerando o Tipo de Vedação e Concentrações de Agar.	45

8	Médias de N ^o de Brotações, Comprimento e N ^o de Plantas Vitrificadas da Fase 2 Considerando o Tipo de Vedação e o Tipo de gel.	47
9	Médias de N ^o de Plantas Vitrificadas da Fase 2 Considerando Diferentes Doses de NH ₄ NO ₃ e CaCl ₂	49
10	Médias de Produção de Matéria Seca da Raiz e da Parte Aérea do Enraizamento <u>in vitro</u> . Considerando Diferentes Tipos e Doses de Auxinas.	61
11	Resumo dos Coeficientes de Correlação Simples para as Variáveis Produção de Matéria Seca da Parte Aérea e da Raiz Considerando o Efeito de Auxinas no Enraizamento do Cravo <u>in vitro</u>	61
12	Médias do Comprimento e Produção de Matéria Seca da Raiz e da Parte Aérea da Fase 4 da Micropropagação do Cravo Considerando Diferentes Formas de Enraizamento.	64
13	Resumo dos Coeficientes de Correlação Simples para as Variáveis Comprimentos da Parte Aérea (X1) e da Raiz (X2) e Massas da Matéria Seca da Parte Aérea (X3) e da Raiz (X4) da Fase 4.	64

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DA VITRIFICAÇÃO E DO DESENVOLVIMENTO DO CRAVO (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*.

Autor: GERALDO ROGÉRIO FAUSTINI CUZZUOL

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo para a micropropagação do cravo, empregando a técnica de cultura de meristemas para limpeza clonal, contornando o problema da vitrificação

Para tanto, determinaram-se as condições controladoras da vitrificação do cravo *in vitro*, analisando o efeito de diferentes níveis do regulador BAP (benzilaminopurina), "Gelrite", ágar, nitrato de amônio, cloreto de cálcio e sistemas de vedação.

Baixos níveis de BAP e nitrato de amônio aliados ao baixo potencial de água do meio, elevados níveis de cálcio e baixa umidade condicionada por tampas de algodão foram capazes de inibir a vitrificação. "Gelrite" revelou-se forte indutor do fenômeno em relação ao ágar.

A taxa de vitrificação nos tratamentos de nitrato de amônio e cloreto de cálcio foi seguida por alterações na atividade da peroxidase. Em altos níveis de amônio, constatou-se baixa atividade da peroxidase,

indicando o envolvimento da enzima no processo. Efeito contrário foi observado quando elevados níveis de cálcio estavam presentes.

Melhores taxas de propagação foram promovidas por elevados níveis de BAP , alto potencial de água do meio e alta umidade, porém com elevado índice de vitrificação.

Alterações na organização estrutural dos tecidos, como células hiperídricas, grandes espaços intercelulares e reduzido sistema vascular caracterizaram o material vitrificado.

Foram testados os efeitos de ácido indoliacético (AIA), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento in vitro, onde todos os tratamentos promoveram a formação de raízes, mas não diferiram do controle, indicando a eliminação do uso de reguladores para esta fase.

Com relação à aclimação, plantas enraizadas in vitro foram confrontadas contra plantas não enraizadas e os resultados indicaram nenhum efeito no crescimento da parte aérea aos 90 dias em casa de vegetação, indicando a supressão da Fase de enraizamento in vitro.

BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF THE VITRIFICATION AND DEVELOPMENT OF CARNATION (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*.

Author: GERALDO ROGÉRIO FAUSTINI CUZZUOL

Adviser: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

SUMMARY

The objective of this work was the establishment of a protocol for micropropagation of carnation by using meristem culture technique to pursue clonal cleaning overcoming vitrification problems.

It consisted on determining the carnation vitrification causes in vitro by assaying the effect of (BAP) benzylaminopurine, "Gelrite", agar, ammonium nitrate, calcium chloride concentrations and of different covering sistem.

Low levels of BAP and ammonium nitrate together with the low water potential, low moistness conditions and high level of calcium were able to inhibit vitrification.

The vitrification rate in ammonium nitrate and calcium chloride treatments was monitored by the activity of peroxidase. At high level of ammonium when high vitrification occurred, a lower peroxidase activity was observed evidencing an association of this enzyme with the vitrification process. An opposite result was observed in medium containing high calcium concentration when low vitrification was observed.

High level of BAP and high moistness content stimulated the micropropagation, even though a vitrification index was also high.

Alterations in the tissue structure as hiperydrical cells, larger intercelular spaces and reduced vascular system were always observed in vitrifical material.

IAA (indoleacetic acid), NAA (naphtalene acetic acid) and IBA (indolebutyric acid) did not show any improvement of the in vitro root formation compared to the control, which showed root development

The acclimation of in vitro rooted plants was tested against non rooted plants. The results indicated the absence of previous rooting effect on the plants development after 90 days kept in greenhouse.

1 . INTRODUÇÃO

A produção industrial de plantas in vitro é uma prática rotineira na agroindústria de flores em países como os Estados Unidos e alguns países da Europa e da Ásia, e em algumas empresas de pequeno e médio porte no Brasil.

É um método biotecnológico já consagrado pelos resultados alcançados tais como a produção de plantas mais uniformes e mais sadias, uma velocidade de crescimento superior aos métodos convencionais, maior produção em menor tempo e menor espaço físico e ainda a obtenção de plantas livres de vírus e outros patógenos através da já renomada técnica de cultura de meristema (CROCOMO, 1989).

Entretanto, variações anormais de ordem anatômica, morfológica ou fisiológica são suscetíveis à algumas espécies, o que pode comprometer programas de micropropagação. Uma das principais anomalias que tem recebido atenção especial é a vitrificação.

Vitrificação é uma reação de hipersensibilidade às condições de estresse do meio de cultura onde diversos fatores interagem simultaneamente interferindo nas principais vias metabólicas como a fotossíntese, respiração e transpiração. Esta reação é caracterizada por desordens fisiológicas generalizados tais como: folhas e caules entumescidos e quebradiços, hipertrofia celular, ausência de dominância apical e caules curtos. Possivelmente, a causa principal de tais sintomas seja uma deficiência de lignina e celulose da parede celular.

Toda essa diagnose reflete-se na taxa de multiplicação e na baixa taxa de sobrevivência das plantas vitrificadas em casa de vegetação, inviabilizando dessa forma a produção de plantas biofabricadas para diversas espécies sensíveis ao fenômeno, dentre essas, o cravo (*Dianthus caryophyllus* L.)

Os eventuais fatores da vitrificação podem ser atribuídos ao nível dos reguladores de crescimento vegetal, potencial de água do meio, níveis de fontes nitrogenadas e de cálcio e ainda a umidade no interior dos frascos. Para contribuir às respostas a essas questões inerentes ao desenvolvimento de plântulas de cravo durante a micropropagação é que foi realizado o presente trabalho tendo em vista os seguintes objetivos:

- . Determinar as condições indutoras e controladoras da vitrificação do cravo in vitro, utilizando-se parâmetros bioquímicos e fisiológicos.

- . Desenvolver um protocolo para a micropropagação do cravo empregando para tanto a técnica de cultura de meristema para limpeza clonal, contornando o problema da vitrificação.

- . Estudar o efeito de reguladores vegetais durante o enraizamento do cravo in vitro e o desenvolvimento durante a aclimação em casa de vegetação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Cultura de Cravo

O cravo é um membro da família Caryophyllaceae, gênero *Dianthus* o qual compreende mais de 300 espécies, derivadas da espécie ancestral comum *Dianthus caryophyllus* nativa do sul da Europa e Oeste da Ásia (MIL et alii, 1990).

O cravo (*Dianthus caryophyllus*) é uma espécie de grande interesse para a floricultura e das mais cultivadas no mundo. As principais áreas de produção inclui a Europa, Norte e Sul da América e a Ásia Oriental, tendo a França, a Holanda, a Itália, os EUA e a Colômbia como os maiores produtores mundiais (HOOGENDOORN, 1987).

No Brasil esta cultura concentrou-se no Estado de São Paulo sendo cultivada em maior escala nas regiões de altitude elevada e temperatura amena, apresentando, porém uma produção flutuante nestas duas últimas décadas, instabilizando o mercado produtor de cravos.

Em 1982 o país arrecadou através da exportação dos produtos da floricultura aproximadamente 7 milhões de dólares (INFORMAÇÃO SEMANAL CACEX, 1982) e em 1987 a produção nacional de flores foi estimada em 100 milhões de dólares (INFORMAÇÃO SEMANAL CACEX, 1987) tornando a atividade uma realidade econômica. O cravo, ocupando o terceiro lugar em produção, é uma das plantas produtoras de flores de corte com grande importância

econômica. A produção de cravos no Brasil atingiu o clímax em 1972 quando foram produzidos 850.873 dúzias de cravos decaindo para 94.342 dúzias em 1991 (BOLETIM ANUAL CEAGESP, 1972 ; 1991).

Sem dúvida, as doenças endêmicas são os causadores principais no declínio da produção e qualidade desta e de outras culturas. Segundo HOLLINGS & BRIERLEY (1964) e CARDOSO (1980), o fungo *Fusarium*, a bactéria *Pseudomonas caryophylli* e o vírus CaMV são os inimigos principais do cravo causando apodrecimento dos seus botões florais, podridão do caule e clorose das folhas, respectivamente. Dentre os vírus parasitas do cravo, três se destacam pela ampla distribuição e danos ao crescimento da planta e qualidade das flores: CaMV, CRSV e CVMV (STONE, 1963 e 1968 ; HOLLINGS & STONE, 1972 e HAKKART & VERLUIJS, 1983).

Devido a presença desses patógenos nos vasos condutores da planta infectada, nos ramos foliares e a sua rápida proliferação, as técnicas de propagação vegetativa como a estaquia, podem comprometer a qualidade do clone mesmo que sejam empregados tratamentos curativos como a termoterapia e o uso de soluções esterilizantes de permanganato nas estacas, comumente aplicados a esta atividade.

Em face aos danos causados pela infecção viral, a produção comercial de cravos é obtida a partir de matrizes livres de vírus. Até o presente, a cultura de meristemas é reconhecida como o caminho mais eficiente para obtenção de plantas livres de vírus (BETTI, 1991). A cultura de meristemas tem sido utilizada também com o objetivo de multiplicação rápida de diferentes genótipos.

2.2. Cultura de Meristemas

De acordo com BETTI (1991), as técnicas de cultura de tecidos vem apresentando uma importância crescente em diferentes áreas de estudo das plantas, incluindo a obtenção de material propagativo livre de vírus. Além disso, a cultura de tecidos é muito útil na micropropagação de clones sadios resultantes de trabalhos de limpeza clonal (MURASHIGE, 1974 e MII et alii, 1990).

Para superar o problema da contaminação patogênica dos propágulos, o cultivo de ápices caulinares e/ou meristemas tem sido usados com êxito em programas de micropropagação (CROCOMO, 1989), uma vez que nesses sítios de intensa atividade celular, comumente há baixa ou nenhuma frequência de microorganismos.

Desde os trabalhos de MOREL & MARTIN (1952) com ápices caulinares de dália, essa técnica tem sido empregada com sucesso na recuperação de plantas livres de doenças.

Para fins de limpeza clonal, geralmente é utilizada a cultura de ápices meristemáticos contendo um ou mais pares de primórdios foliares. STONE (1968) produziu plantas de cravos livres dos vírus CarMV, CarVMV, CRSV e CarLV aplicando a técnica de cultura de meristema, chegando a obter 64% de plantas livres desses patógenos a partir dos meristemas apicais.

A morfogênese do explante no meio artificial depende do tamanho do ápice e do estado fisiológico da planta doadora. As dimensões desses ápices variam entre as diferentes espécies, estando entre 0,1 a 0,5mm de comprimento (SUTTER & LANGHANS, 1979). Ápices menores tem menos chance de estarem contaminados por microorganismos, no entanto, a sua capacidade de regeneração é inferior aos ápices de maiores dimensões. Corroborando com estas informações, STONE (1963) relatou que em explantes de cravo

menores do que a 0,5mm é reduzida a frequência de vírus, bactérias ou fungos, porém, estes explantes apresentaram baixo índice de sobrevivência, contrário aos explantes maiores.

Geralmente, em cravo tem-se utilizado com sucesso ápices meristemáticos com um ou mais pares de primórdios foliares (DAVIES et al., 1977; GUKASYAN et al., 1977; PHILLIPS & MATTHEUS, 1960) indicando o envolvimento dos primórdios no desenvolvimento morfo genético do explante.

Para o seu bom desenvolvimento, o explante requer um meio de cultura rico em sais minerais, vitaminas e reguladores de crescimento (auxina, citocinina e giberelinas). O meio de cultura mais utilizado é o meio de MURASHIGE & SKOOG (1962) com algumas alterações específicas para cada cultura. As dosagens dos reguladores do crescimento são contraditórias mesmo para uma determinada cultura, sendo que para o cravo as concentrações de 2-10 μ M de cinetina combinadas com 0,1-0,5 μ M de auxina proporcionaram melhores resultados na regeneração de meristemas com um par de primórdio foliar (PETRE & LANDA, 1974; EARLE & LANGHANS, 1975).

As auxinas e as citocininas são substâncias reguladoras chaves no desenvolvimento dos explantes e ambas estão envolvidas na divisão celular e crescimento do meristema. A interação entre as duas parece determinar a iniciação de novas folhas. Segundo JACOBS (1961) e SHABDE & MURASHIGE (1977) a síntese de auxina ocorre no segundo par de primórdio foliar, sendo que no terceiro par se dá a síntese de citocinina.

2.3. Micropropagação

A propagação vegetativa in vitro, também denominada micropropagação em função dos propágulos

utilizados, é um método biotecnológico indiscutivelmente já consagrado, tendo sido considerada pela literatura especializada um marco e uma grande promessa para a agricultura na atualidade. As principais plantas biofabricadas compreendem as ornamentais e as plantas frutíferas.

A multiplicação clonal in vitro apresenta inúmeras vantagens, em relação a propagação vegetativa tradicional. Dentre essas, SAGAWA & KUNISAKI (1990) enumeraram a rapidez de multiplicação, controle efetivo de doenças, facilidade de manuseio e transporte, independência da sazonalidade, espaço reduzido para cultivo, além do que apenas pequenas porções da planta são usadas para produção em escala comercial. LIBANIO & WITMER (1987) estudando as diferenças entre plantas de crisântemos propagadas in vitro e in vivo constataram que o material propagado in vitro é mais precoce e homogêneo apresentando expressiva superioridade na produção e qualidade das flores. TAKAYAMA & MISAWA (1982) também obtiveram plantas fenotipicamente mais homogêneas propagando begônia in vitro.

Mundialmente, 200 a 300 milhões de plântulas in vitro estão sendo fabricadas por ano. Neste contexto, a propagação de plantas ornamentais engloba mais de 36 famílias e 75 gêneros. Dentre as plantas ornamentais, as orquídeas, os crisântemos e os cravos dominaram a fase inicial da micropropagação, depois desenvolveram-se protocolos para plantas ornamentais envasadas, como as bromélias, dracenas e *Dicygotheca*.

MURASHIGE (1974) relatou um expressivo aumento no número de espécies utilizadas nas técnicas de micropropagação principalmente em ornamentais. Até 1974 foram catalogadas 150 espécies micropropagadas, com esse número dobrando até o ano de 1988. Estima-se que 1000 novas espécies são propagadas hoje in vitro. O prognóstico é que, ao final deste século, mais de 3.000 genótipos serão

micropropagados, porém a maioria será de plantas ornamentais (DEBERGH, 1986).

DEBERGH & MAENE (1981) e DEBERGH & READ (1991) estabeleceram o conceito de estágios de desenvolvimento no processo de propagação in vitro. Este esquema padrão para sistemas de micropropagação é apresentado esquematicamente na Figura 1, e divide-se resumidamente em:

Fase 0 - indispensável na preparação das matrizes doadoras de explante;

Fase 1 - obtenção de culturas assépticas;

Fase 2 - multiplicação de gemas;

Fase 3 - Alongamento e enraizamento das plântulas in vitro;

Fase 4 - Aclimação e/ou enraizamento ex vitro.

Figura 1 - Esquema Geral da Micropropagação do Cravo.

2.4. Organogênese

HANDRO & FLOCH (1990) descreveram que tecidos diferenciados dos explantes sofrem divisões celulares em meio de cultura recuperando a atividade meristemática (totipotência). O padrão de diferenciação pode conduzir a um grau de organização morfo-anatômica peculiar, que no caso de caracterizar-se em um órgão definido, constitui-se o processo denominado organogênese.

Há muito se sabe que as citocininas induzem a desdiferenciação celular e a proliferação de gemas adventícias, daí a sua ampla utilização na fase de multiplicação da organogênese. O tipo e a concentração da citocinina são fatores chaves no sucesso da organogênese. Das citocininas comercialmente disponíveis, o BAP tem sido considerado, por excelência, mais eficaz na indução de gemas adventícias. HU & WANG (1983) levantaram a frequência de utilização de cada citocinina em meios de isolamento em cerca de 100 espécies, e verificaram que o BAP é utilizado em 68% dos meios, a cinetina 23% e o 2iP e a zeatina em 9%.

As concentrações de citocinina empregadas na organogênese podem variar bastante para cada espécie, estando em geral entre 0,1 a 5,0 mg/l. EARLE & LANGHANS (1975) utilizaram 9,3 μM de cinetina e 0,11 μM de NAA na formação de gemas adventícias de nódulos caulinares de cravo via organogênese direta. Elevado índice de perfilhamento foi obtido por KIM & KANG (1986) ao combinar 0,1 ppm de ANA com 1,0 ppm de BA em meio MS com produção média de 7,9 brotações por nó caulinar. Já CHOUDHARY (1991) conseguiu uma média de 8,7 brotações utilizando 0,25 μM de BA com 0,01 μM de ANA. MILLER (1991) determinou a melhor combinação como sendo 7,5 μM de BA + 0,5 μM de ANA. IOANNOV (1990) com 2,0 mg/l de cinetina obteve 33 brotações por nó caulinar de cravo na fase de multiplicação.

2.6. Vitrificação

Também descrita na terminologia por estado teratomata, hiperidratação, translusência e intumescência, a vitrificação tem demonstrado ser um desafio no estabelecimento das culturas in vitro. ZIV (1991) listou 30 espécies que vitrificam quando propagadas in vitro. Entre 1990 a 1992 foram publicados cerca de 40 trabalhos sobre o assunto onde as principais causas enumeradas foram atribuídas ao potencial de água, umidade, reguladores e níveis de nitrogênio e do cálcio

2.6.1. Alterações Anatômicas

Distúrbios na filotaxia e anatomia celular são os principais sintomas da vitrificação. Plantas vitrificadas desenvolvem abundantemente folhas suculentas, longas e largas, translúcidas, quebradiças e ainda hiperídricas (DEBERGH, 1983; LESHEM et al., 1988b; WERKER & LESHEM, 1987 ; ZIV et al., 1987). Observam-se também ausência de organização normal em grana e estroma (WEITZTEIN & SAMMER, 1982 ; 1983); baixo nível de clorofila (PHAN & LETOUZÉ, 1983 ; ZIV et al., 1983); hábito arbustivo com densa folhagem e reduzida taxa de multiplicação e capacidade de enraizamento (LESHEM & SACHS, 1985). Para LESHEM et al. (1987) todas essas características podem permanecer estáveis por várias subcultura in vitro.

Estudos anatômicos realizados por SUTTER & LANGHANS (1979); WELKER & LESHEM (1987) e LESHEM et al. (1988b) revelaram uma desorganização generalizada nos tecidos e órgãos de espécies vitrificadas. VIEITEZ et al. (1985) notaram uma intensa proliferação das células do parênquima foliar possuindo de 8 a 10 camadas em corte transversal ao invés de 4-5 camadas nas folhas normais. Em maçã, o sistema lacunoso hiperdesenvolveu até 5 vezes o

volume da folha normal. De acordo com VIEITEZ et al. (1985) e KEVERS & GASPAR (1986) nas folhas vitrificadas o parênquima paliçádico assume um aspecto esponjoso em todo o mesofilo apresentando largos espaços extracelulares configurando ao tecido um aspecto de semi-desintegração. Parênquima cortical e medular hipertrofiado também foi observado por VIEITEZ et al. (1985) em caule de *Castanea sativa*.

KEVERS et al. (1984); VIEITEZ et al. (1985); KEVERS et al. (1987); e ZIV et al. (1987) apontaram como a causa principal da vitrificação os baixos níveis de lignina e de celulose de parede com a concomitante redução da pressão de parede, gerando células hiperídricas. Em alguns casos, os níveis desses componentes celulares pode cair para 2/3 em material vitrificado.

LESHEM & SACHS (1985) e WELKER & LESHEM (1987) descreveram que o xilema é pouco diferenciado tanto em folha quanto em caule de plantas vitrificadas, apresentando número reduzido de elementos de vasos na folhas de cravo.

Alguns trabalhos sugerem que em plantas vitrificadas não há transporte polar de auxina, fato esse constatado pela ausência de dominância apical nas plantas vitrificadas (SACHS, 1981 e 1984).

Investigações anatômicas demonstraram que os estômatos de folhas vitrificadas são deformados e não funcionais e permanecem abertos mesmo sob condições de escuro, estresse hídrico, ABA e Ca^{++} , sinais esses que usualmente causam fechamento dos estômatos (BRAINERD et al. 1981a e b; ZIV, 1987 e FUCHIGAMI et al. 1981). Em maçã e cravo, os estômatos não responderam aos tratamento de ABA, elevada concentração de CO_2 ou soluções hipertônicas de manitol ou sacarose. ZIV et al. (1987) constataram a presença de estômatos volumosos em folhas vitrificadas de cravo os quais chegavam a possuir duas vezes o tamanho

daqueles das folhas normais, sendo os cloroplastos das células guardas maiores, mas em número reduzido.

Análises histoquímicas das células guardas de folhas vitrificadas de cravo revelaram baixos níveis de cutícula, pectina e celulose com depósitos de calose nas células guardas (WERKER & LESHEM, 1987; ZIV et al., 1987 e ZIV & ARIEL, 1988). Estes estudos demonstraram ainda uma demanda de parede celular ao redor do ostíolo, o que poderia ser atribuído a falta de elasticidade da parede. Essas alterações estomatais aliadas a ausência ou redução de cera cuticular da epiderme são consideradas as principais causas da baixa taxa de sobrevivência de plantas vitrificadas na fase de aclimação (ZIV et al., 1987; PREECE & SUTTER, 1991).

SUTER & LANGHANS (1979) investigando a relação entre as alterações morfo-anatômicas de plantas vitrificadas de cravo e a fase de aclimação, constataram que as plantas anormais dessecaram mesmo usando cobertura plástica e sombrite para diminuir a transpiração; e que menos de 10% das plantas vitrificadas sobreviveram em casa de vegetação. Esses autores ainda apresentaram um dado surpreendente: 90% das plantas de cravo cultivadas in vitro apresentaram-se vitrificadas com ausência de cera epicuticular.

2.6.2. Reguladores do Crescimento

O mecanismo de ação dos reguladores vegetais no controle da vitrificação ainda não está bem compreendido, e o seu efeito na morfogênese anormal dos explantes é contraditório nas espécies estudadas.

Em seus trabalhos, DENCSO (1987), LESHEM & SACHS (1985) e LESHEM et al. (1988a e 1988b) constataram que o balanço entre auxina e citocinina é um forte promotor da vitrificação. Quando o regulador em excesso era a

citocinina BAP, as plantas de cravo apresentaram um aspecto arbustivo que logo perfilhavam, porém não vitrificaram. Já, quando o hormônio em excesso era a auxina, as plantas não perfilharam mas vitrificaram. No entanto, efeito inverso foi diagnosticado por LESHEM (1988a e 1988b) em melão (*Cucumis melo*).

LESHEM & SACHS (1985) e LESHEM et al. (1988a e 1988b) sugeriram uma influência citocínica em plantas de cravo vitrificadas in vitro. Esses autores acreditam que o excesso de AIA no meio pudesse estimular a biossíntese de citocinina em cravo. Assim, a vitrificação seria causada somente pela citocinina endógena, enquanto em outras espécies como em melão, maçã e coníferas, pela citocinina exógena.

É relatado em diversos trabalhos que meio de cultura suplementado com BAP induz a vitrificação (VON ARNOLD & ERIKSSON, 1984; GASPAR et al. 1984; PAQUES & BOXUS, 1987a e c; LESHEM et al. 1988a e b). Em coníferas, cravos e pessegueiro, baixos níveis de citocinina reduziram a vitrificação (DENCISO, 1987; ZUCHERELLI, 1979). Entretanto, em algumas espécies frutíferas, a citocinina não teve efeito, enquanto a auxina esteve envolvida na morfogênese anormal (ORLIKOWSKA, 1987).

Desde os trabalhos de RAYLE & CLELAND (1970) e HAGEL et al. (1971), sabe-se que a auxina age nas propriedades de parede celular alterando sua plasticidade, uma das características da vitrificação. Foi cogitado que meios indutores ricos em auxina, seriam o fator primário da vitrificação. Contudo, DEBERGH (1981) demonstrou que alterações de parede não era causa auxinínica, uma vez que a aplicação de TIBA ao meio, um bloqueador da ação auxínica, não alterou a frequência de plantas vitrificadas de *Cynara* sp. Foi especulado ainda, a possibilidade da auxina agir sinergisticamente na biossíntese de giberelina, outro hormônio que também tem ação na plasticidade da

parede celular. Mas, DEBERGH (1981) observou que mesmo aplicando CCC (cloreto 2 - clorotil - trimetilamônia) um bloqueador da biossíntese de GA, foram desenvolvidas plantas vitrificadas.

Para KEVERS et al. (1987) a auxina do meio deve atuar no afrouxamento da parede e, indiretamente, age no controle da biossíntese de etileno. Confirmando esta hipótese KEVERS et al. (1984) também correlacionaram o efeito da auxina na síntese de etileno, e este seria o responsável pelas alterações estruturais observadas. Essa idéia vem ganhando credibilidade, uma vez que tem sido relatado o acúmulo de etileno relacionado com a vitrificação (RIOV J. & YANG, 1982; YOSHI & IMASEKI, 1982, KEVERS & GASPAR, 1985; KEVERS et al. 1984).

2.6.3. Potencial de Água e Umidade

Dois importantes componentes das condições de cultura de tecido tem sido associados à morfogênese anormal: o estado físico e químico do meio e a umidade relativa nos frascos. Diversos autores são unânimes ao constatarem uma interação da concentração da substância geleificante com o potencial matricial, à umidade relativa e a disponibilidade de água do meio, considerados fatores preponderantes da vitrificação (DEBERGH et al., 1981; HAKKAART & VESLUIJS, 1983).

Meio líquido ou com baixas concentrações de ágar exibiu elevada frequência de vitrificação, porém no meio líquido o efeito foi mais intensificado (ZIV et al. 1987 e KEVERS et al. 1988).

A consistência do meio é um importante fator intimamente relacionado à vitrificação; e os tratamentos que acarretam na redução do potencial de água contribuíram satisfatoriamente para a eliminação total ou parcial do efeito.

DEBERG et al. (1981); ZIV et al. (1983); HARKKART & VERSLUIJS (1983); BORNMAN & VOGERLMANN (1984) e CHOUDHARY (1991) superaram a morfogênese anormal aumentando o grau de rigidez do meio elevando a concentração de ágar de 0,6% para 1,1%. Resultado similar foi obtido por PASQUALETO et al. (1986) elevando a concentração de "gelrite" para 6.0 g/l. No entanto, tais tratamentos, consistindo na redução do potencial de água do meio, levaram a uma sensível redução na taxa de propagação e no tamanho das brotações. Segundo DEBERGH (1983 ; 1984) a condição de baixo potencial de água afeta a disponibilidade de água e substâncias do meio de cultivo, dentre essas, as citocininas.

De acordo com DEBERGH et al. (1981) e DEBERG (1983), a promoção da vitrificação por altos níveis de citocinina pode ser contornada elevando a concentração de ágar, limitando dessa forma, a mobilidade de reguladores sob baixo potencial matricial dado pelas partículas de gel; porém, compromete a taxa de propagação.

Quanto ao tipo de substância geleificante, DEBERGH (1983); BORNAMAN & VOGELMAN (1984) e PASQUALETTO et al. (1986 e 1988) constataram que o "gelrite" é um potente indutor da vitrificação, chegando em alguns casos, como em maçã, a provocar 100% de vitrificação.

A umidade relativa representa um outro importante fator no controle da vitrificação. Praticamente todos os tratamentos que acarretam redução da umidade, contribuem para a redução da vitrificação (KATAEVA et al., 1991 ; RITCHIE et al., 1991). Alguns tratamentos que podem ser utilizados são o aumento da concentração de ágar ou redução da umidade utilizando outros tipos de vedação dos frascos que permitam uma maior troca gasosa entre o meio interno e externo.

HAKKART & VERLUIJS (1983) conseguiram reduzir a vitrificação para níveis bastante insignificantes

(< 4%) ao substituírem tampas de papel alumínio por outras de melhor aeração como tampas de algodão. Entretanto, essas novas condições de baixa umidade e maior aeração, implicaram no baixo desenvolvimento das plantas.

2.6.4. Componentes Inorgânicos

Meios ricos em nutrientes minerais como o MS, demonstraram serem altamente promotores da vitrificação para algumas espécies (DAGUIN & LETOUZÉ, 1986 ; PAQUES & BOXUS, 1987a), enquanto meio com baixos níveis de minerais, ou somente com a metade de sais MS melhorou a morfogênese em plantas de cravos e pepino (ZIV & GADASI, 1986 ; ZIV et al., 1987a).

A redução da concentração de nitrogênio na forma amoniacal (NH_4NO_3) tem sido utilizada, satisfatoriamente, como uma medida preventiva no combate à vitrificação.

Diminuindo o nível de amônio do meio, DAGUIN & LETOUZÉ (1986) e LEONHARDT & KANDELER (1987) observaram um aumento na lignificação e redução da vitrificação em salgueiro, ameixa e cactos. ZIV & ARIEL (1988) também alcançaram resultados similares em cravo diminuindo a relação $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$.

Da mesma forma, ZIV et al. (1987) aumentaram a proporção de plantas normais em cultura de crisântemo reduzindo os níveis de nitrato de amônio ou eliminando-o completamente do meio MS.

PHAN & LETOUZÉ (1983), PHAN & HEGEDUS (1986), DAGUIN & LETOUZÉ (1985) e LETOUZÉ & DAGUIN (1987) demonstraram uma relação entre a vitrificação e atividade enzimática. Em material vitrificado, a atividade das enzimas PAL, peroxidase e Coa ligase foi baixa em relação ao material normal. ROBERTS & MILLER (1983) e KEVERS et al. (1984) tem relacionado o decréscimo da atividade dessas

enzimas em consequência do súbito aumento de etileno em material vitrificado. Entretanto, enzimas da vias biossintéticas de aminoácidos tiveram sua atividade aumentada em relação ao material não vitrificado. KANAMORIET et al. (1972); LETOUZÉ & DAGUIN (1983); DAGUIN & LETOUZÉ (1986); DAGUIN & LETOUZÉ (1987) observaram uma relação no aumento da vitrificação e alta atividade de glutamato desidrogenase ocasionada pelas elevadas concentrações de amônio em *Salix*.

Níveis de cálcio tem sido considerado por diversos autores de particular relevância na morfogênese anormal (BORKOWSKA, 1987; SINGHA et al., 1990).

Elevando o nível de Ca^{++} do meio, foi observada uma redução da vitrificação tanto em herbáceas (ZIV et al., 1987a,b) quanto em plantas lenhosas (KREUTMER et al., 1984).

KEVERS & GASPAR (1985b e 1986) e KEVERS et al. (1988) detectaram baixos níveis de Ca^{++} e Mg^{++} em plantas vitrificadas em relação as plantas cultivadas em casa de vegetação. Em meio liquido esse efeito foi muito mais marcante. SHA et al. (1985) verificaram que a saturação de vapor de água nos frascos diminui o fluxo transpiratório nas culturas, acarretando déficit de elementos como o cálcio, que possui baixa mobilidade.

GASPAR et al. (1987) e ZIV & ARIEL (1990) evidenciaram uma redução da vitrificação elevando o nível de cálcio. SINGHA et al. (1990) reduziram a frequência de marmelo vitrificado aumentando a concentração de Ca^{++} no meio para 27 mM , acompanhado de redução substancial de necrose; entretanto, ocorreu redução no crescimento.

2.7. Enraizamento

A penúltima fase da micropropagação (Fase de enraizamento), consiste na emissão de raízes pelas plantas provenientes da Fase de multiplicação para o posterior transplante.

Diversos componentes do meio de cultura são freqüentemente alterados visando a melhor promoção do enraizamento: diluição da concentração salina do meio MS, redução de sacarose e meio suplementado com carvão ativado são algumas das alterações mais experimentadas.

Contudo, são os níveis e a qualidade da auxina os fatores que, em geral, tem maior influência no enraizamento, sendo o AIB, o ANA e o AIA, as auxinas mais comumente usadas.

Em sua revisão, HU & WANG (1983) verificaram que 86% dos meios de enraizamento continham auxina, e que o ANA parece ser a auxina mais eficaz para estimular o enraizamento in vitro. O ANA está presente em 53% dos meios contra 29% para o AIB e 11% para o AIA. As concentrações mais frequentes estão na faixa de 0,1 a 1 mg/l.

Baixos níveis de auxina tem sido utilizado na formação de raízes de cravo in vitro. PETRU & LANDA (1974) usaram 2,2 μ M de ANA em meio de MOREL enquanto ROEST & BOKELMAN (1981); LUBOMSKI & JERZY (1989) e BARANCOK (1991) obtiveram enraizamento satisfatório do cravo em meio MS suplementado de 5,5 M de ANA, 0,1 mg/l de AIA e 5-10 μ M de AIA, respectivamente. Para CHOUDHORY (1991) melhor enraizamento foi proporcionado por 10 μ M IBA em meio líquido. IOAMOV (1990) determinou o ANA como sendo a melhor auxina para emissão de raízes de cravo na concentração de 1 mg/l.

DEBERGH & MAENE (1981) afirmaram que a baixa sobrevivência e lento crescimento das plantas em casa de vegetação sejam devido a ausência de pêlos radiculares nas

raízes formadas in vitro e a morte das raízes após o transplante. Entretanto, segundo McCLELLAND (1989) citado por PREECE & SUTTER (1991)¹, novas raízes laterais e adventícias são formadas em substituição àquelas que morreram durante a aclimação.

Dependendo da espécie, o enraizamento pode ser realizado em condições ex-vitro, porém, pode apresentar alta taxa de mortalidade. Neste caso, PREECE & SUTTER (1991) aconselham que o enraizamento deve ser conduzido em condições in vitro mesmo com a elevação dos custos.

DEBERGH & MAENE (1981) estabeleceram um novo modelo de micropropagação visando a otimização e barateamento do processo. No caso de mudas enraizadas ex-vitro com baixas perdas, então o enraizamento e aclimação pode ser feito simultaneamente. Este procedimento pode substancialmente reduzir os custos da micropropagação.

2.8. Aclimação

Um número de plantas micropropagadas não sobrevivem com a transferência para casa de vegetação, cujo ambiente é caracterizado por baixa umidade e altos níveis de luminosidade. Por isso, a maioria das espécies requer um processo de aclimação que assegure maior sobrevivência e crescimento vigoroso quando transferidas para o solo.

A causa principal da baixa sobrevivência foi apontado por BRAINERD & FUCHIGAMI (1982) e SUTTER & LANGHANS (1982) à perda excessiva de água. Plantas de couve-flor, cravo e repolho cultivadas in vitro apresentaram deficiência de cera epicuticular cuja função é limitar as perdas de água através da transpiração (GROUT & ASTON, 1978; SUTTER & LANGHANS, 1979 e 1982).

Baseado nos estudos relacionados à formação de cera epicuticular com o ambiente, GROUT & ALSTON (1977)

atribuíram à alta umidade nos frascos de cultura como o fator responsável pela deficiência da epicutícula. Corroborando com essa informação, SUTTER & LANGHANS (1982) e WARDLE et al. (1983) estimularam a síntese da epicutícula reduzindo a umidade nos frascos para 35%. A redução da umidade pode ser conseguida mudando o sistema de vedação dos frascos com a utilização de tampas plásticas ou tampas de algodão.

Alterações estruturais dos estômatos também tem sido relatado em plantas crescidas in vitro. Estudos de microscopia eletrônica revelaram que em todas espécies observadas, os estômatos permaneciam abertos nas condições in vitro, e inábeis ao fechamento por períodos variados quando as plantas eram transferidas para casa de vegetação.

Segundo MARÍN et al. (1988), em *Prunus*, 75% dos estômatos fecharam após 15 min em condições ex-vitro, sendo registradas baixas perdas de água. Em maçã o período de abertura dos estômatos foi prolongado seguido de alta taxa de transpiração, porém, quando os frascos de cultura foram abertos e expostos à uma umidade relativa de 30 a 40% durante 5-6 dias em laboratório, os estômatos responderam satisfatoriamente às condições ambientais indutoras ao seu fechamento (BRAINERD & FUCHIGAMI, 1981a). Para a cerejeira, bastou uma exposição de 1h às condições laboratoriais para que 78% dos estômatos se fechassem (SUTTER, 1988).

PREECE & SUTTER (1991) comentaram que além da transpiração, a fotossíntese é uma outra via metabólica bastante afetada quando a planta sai de um ambiente heterotrófico (in vitro) para outro autotrófico (ex-vitro) onde ela precisa fotossintetizar para sobreviver. GROUT & ALSTON (1978) detectaram uma baixa atividade fotossintética durante as duas primeiras semanas de aclimação de couve-flor micropropagada. Com morango, não aumentou a fixação do CO₂ nas folhas originadas in vitro, indicando um déficit do aparato fotossintético (DONNELLY & VIDAVER, 1984) nas folhas

produzidas in vitro. Plantas de videira mostraram aproximadamente 1/3 da taxa fotossintética em relação às plantas crescidas em casa de vegetação (SMITH et al., 1986). Todavia, há espécies que se comportam muito bem no transplântio, adaptando-se perfeitamente às condições autotróficas, com concomitante aumento da taxa de fotossíntese (como exemplo, *Dieffenbachia*).

Em geral, a limitada taxa de fotossíntese em plantas crescidas in vitro tem sido atribuída , entre outros fatores, à inadequada troca gasosa nos frascos (FUJIWARA et al., 1987; KOZAI et al., 1987a,b).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), Departamento de Química, ESALQ, no Campus da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba-SP.

Matrizes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) procedentes da Holambra - SP, foram envazadas e aclimatadas em casa de vegetação do CEBTEC em substrato (terra + argila) autoclavado por 2h à 120°C sob 1,5 atm de pressão.

Plantas com 40 dias de idade, após o envasamento, tiveram seus ápices removidos para utilização como fonte de explante. Apices com até 4 pares de folhas foram colhidos e levados ao laboratório onde foi realizada a limpeza do material, tirando-se as folhas até alcançar as primeiras folhas em expansão.

Os ápices foram mantidos em solução detergente de hipoclorito de sódio a 1% (água sanitária diluída à 20%, tendo o cloro como princípio ativo) por 20 min em frascos de Erlenmeyer. Após o tratamento com detergente, o material foi lavado três vezes em água destilada esterilizada em condições assépticas na câmara de fluxo laminar. Todo o material utilizado nesta e nas outras fases foram autoclavados à 120°C sob 1,5 atm durante 15 minutos.

Com o auxílio de bisturi, pinça e estiletes, ápices meristemáticos medindo aproximadamente 0,3 mm, tendo um ou dois pares de primórdios foliares, foram isolados sob lupa e inoculados em frascos de 10 cm x 08 cm

contendo 15 ml do meio de MURASHIGE & SKOOG (1962) (Tabela 1), com valor do pH ajustado a 5,5.

A incubação do material se deu em sala de crescimento com intensidade luminosa de 2000 lux, fotoperíodo de 12h e temperatura de 25°C.

O delineamento adotado para a Fase I e II foi inteiramente casualizado.

Tabela 1 - Composição do Meio de Cultura Básico de MURASHIGE e SKOOG (1962).

Componentes	mg/l	mM
Macronutrientes:		
NH ₄ NO ₃	1.650	20,6
KNO ₃	1.900	18,8
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	2,99
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	1,5
KH ₂ PO ₄	170	1,25
Micronutrientes:		
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	0,100
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	0,0299
H ₃ BO ₃	6,2	0,100
KI	0,83	0,005
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,001
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,0001
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,0001
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	0,100
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	0,100
Glicina	2,0	0,0266
Acido nicotínico	0,5	0,004
Piridoxina.HCl	0,5	0,0024
Tiamina.HCl	0,1	0,0003
Mio-inositol	100	0,55
Sacarose	30.000	87,6

O trabalho foi dividido em 4 fases:

FASE I - Obtenção de Cultura Asséptica

3.1. Efeito de BAP na Fase 1

O meio de cultura básico foi suplementado de seis concentrações de BAP: 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/l, tendo 20 repetições por tratamento. Usou-se 8 g/l de ágar como agente solidificante.

A variável analisada foi a frequência da vitrificação e a performance do desenvolvimento das plantas após 40 dias da inoculação, obedecendo a um critério de notas com valores de 0 a 7 atribuídas às características morfológicas do vegetal (aspecto das folhas, estrutura do caule e a arquitetura da planta).

3.2. Efeito da Concentração do Agar e Tipos de Vedação na Fase 1

Este experimento em fatorial do tipo 2 x 2, constituiu-se de duas concentrações de ágar: 8 e 12 g/l combinadas com dois tipos de vedação dos frascos: papel alumínio e tampas de algodão. O meio básico foi suplementado com 0,5 mg/l de ANA e 0,05 mg/l de BAP. O experimento constituiu de 10 repetições por tratamento.

O critério de avaliação foi o mesmo adotado para o Experimento 3.1.

3.3. Efeito de "Gelrite" na Fase 1

Foram testadas cinco concentrações de "gelrite": 2,3; 2,7; 3,2; 3,8 e 4,5 g/l em meio básico de MS suplementado de 0,5 mg/l de ANA mais 0,05 mg/l de BAP. O experimento foi constituído de 10 repetições e o critério de avaliação foi o mesmo adotado para o Experimento 3.1.

Fase II - Multiplicação

Com a obtenção de plantas regeneradas livres de contaminantes, iniciou-se então a fase de multiplicação. Explantes oriundos da região caular, medindo aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram excisados das plantas regeneradas em condições assépticas e transferidos para meio de multiplicação. A avaliação foi realizada aos 40 dias após a inoculação dos explantes.

3.4. Efeito de BAP na Fase 2

Ao meio básico foi acrescentado BAP em seis concentrações : 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/l suplementado de 8 g/l de ágar, tendo 20 repetições por tratamento.

A variável analisada foi o número e comprimento de brotações adventícias por explante e a frequência da vitrificação. Determinou-se que as medidas seriam tomadas somente para as brotações de comprimento maior ou igual a 0,5 cm.

3.5. Efeito de "Gelrite" na Fase 2

Testou-se cinco concentrações de "gelrite": 2,5; 3,0; 4,0; 6,0 e 9,0 g/l em meio de MS suplementado de 0,5 mg/l de BAP, tendo 10 repetições por tratamento.

A variável analisada foi o número e comprimento das brotações adventícias por explante e a frequência da vitrificação. O critério para as medições foi o mesmo adotado para o Experimento 3.4.

3.6. Determinação do Potencial de Água

Adotou-se o método da higrometria de par termoelétrico, pelo uso de câmaras de amostras modelo C-52

e microvoltímetro higrométrico modelo HR-33, da Wescar Inc. As medidas foram realizadas após um tempo mínimo de equilíbrio das amostras nas câmaras de 2 horas. Mediu-se o potencial de água do meio básico tendo como agente solidificante "gelrite" nas concentrações de 2,5; 3,0; 4,0; 6,0 e 9,0 g/l; e da folha e região nodal de plantas normais e vitrificadas.

3.7. Corte Histológico

O material foi cortado à mão livre, desidratado em série alcoólica e corados com vermelho congo e verde iodo (SASS, 1951) e montados em lâminas histológicas semi permanente.

3.8. Efeito Qualitativo de Gel e Tipos de Vedação na Fase 2

Testaram-se dois tipos de vedação: papel alumínio e tampas de algodão combinados com 11 g/l de ágar e 4,5 g/l de "gelrite". O meio básico foi suplementado com 0,5 mg/l de BAP, 10,3 mM de NH_4NO_3 e 12,0 mM de CaCl_2 .

As variáveis analisadas foram o número e comprimento de brotações adventícias por explante, e a frequência da vitrificação.

3.9. Efeito de Níveis NH_4NO_3 de CaCl_2 na Fase 2

Explantos nodulares foram transferidos para meio básico constituído de quatro concentrações de nitrato de amônio: 0,0; 20,6; 61,8 e 130,0 mM e quatro concentrações de cloreto de cálcio: 0,0; 3,0; 9,0 e 15,0 mM suplementado de 0,5 mg/l de BAP, em presença de 4,5 g/l de "gelrite", tendo cada tratamento 10 repetições, em frascos vedados com tampas de algodão.

A variável analisada foi a frequência de plantas vitrificadas após 30 dias de cultivo.

3.10. Determinação de Proteína Total Solúvel

No material vegetal obtidos nos tratamentos sobre níveis de fontes nitrogenadas e de cálcio do Experimento 3.9, determinou-se o teor de proteína total solúvel (LOWRY et al., 1951) das plantas com 30 dias após a inoculação, em amostras aleatórias, preparando-se duas amostras para essa determinação. O material foi masserado à 4°C na proporção de 1:1 com a solução tampão constituída de Tris-HCl 0,05 M e NaCl 0,05 M, pH 7,5 e centrifugado a 20.000 g por 15 minutos.

3.11. Atividade de Peroxidase

Extratos das amostras dos tratamentos "níveis de fontes nitrogenadas e de cálcio" do Experimento 3.9 foram obtidos em tampão fosfato de sódio, pH 6,1 a 0,1 M na proporção 1:5. A mistura reativa se constituiu de 0,25 ml de água oxigenada 0,1 M 30 V; 0,5 ml de pirogalol 0,02 M como doador de hidrogênio; 1,0 ml de extrato diluído em água destilada na proporção 1:40; o volume foi completado a 3 ml com solução tampão. O controle foi formado por todos os reagentes com exceção da água oxigenada.

A análise foi realizada de acordo com FERHRMANN & DIAMON (1967), lendo-se a 470 nm no espectrofotômetro U-3210 da HITACHI após 10 min da adição da água oxigenada à 25°C. A atividade da peroxidase foi expressa em $\Delta 470/\text{min}$ por grama de massa de matéria fresca.

Fase III - Enraizamento In Vitro

3.12. Efeito de Reguladores no Enraizamento in vitro

Objetivando a determinação das exigências qualitativa e quantitativa aos fitorreguladores no enraizamento do cravo in vitro, foi instalado este experimento na forma de um fatorial do tipo 3 x 4 onde foi testado o efeito dos reguladores AIA, ANA e AIB nas concentrações de 0,0; 0,25; 0,5 e 1,0 mg/l.

Brotações adventícias de aproximadamente 2 cm de comprimento foram transferidas assepticamente para frascos vedados com tampas de algodão, contendo 15 ml de meio MS suplementado de 4,5 g/l de "gelrite".

O delineamento foi em blocos inteiramente casualizados, cujos tratamentos foram distribuídos em blocos constituídos de 10 parcelas, cada parcela compreendendo 5 explantes. As parcelas foram distribuídas aleatoriamente dentro de cada bloco.

As variáveis analisadas foram a massa de matéria seca da raiz e da parte aérea medidas após 48h de incubação do material em estufa à 50°C aos 40 dias da instalação.

Fase IV - Aclimação e Enraizamento em Casa de Vegetação

3.13. Desenvolvimento em Condições ex-vitro

Visando, a) eliminação das desvantagens observadas no enraizamento in vitro, dentre as quais, o elevado custo desta fase; e b) redução das perdas acometidas às plantas micropropagadas quando as mesmas são transferidas para condições autotróficas e de baixa umidade

em condições ex-vitro, elaborou-se o presente experimento onde foram envazadas diretamente em substrato (areia + terra + argila na proporção 1:1:1) sob sombrite em casa de vegetação, plantas enraizadas in vitro com 0,5 mg/l de AIA; plantas enraizadas in vitro sem o uso de reguladores e plantas sem passarem pela fase de enraizamento in vitro.

Essas plantas foram cultivadas in vitro em frascos com tampas de algodão (baixa umidade) durante 30 dias antes da transferência para as condições ex-vitro.

O experimento constituiu-se de 20 repetições por tratamento num delineamento inteiramente casualizado, coletando-se 10 amostras aleatoriamente para análise comparativa, cujas variáveis foram o comprimento e a massa de matéria seca da raiz e da parte aérea. O material foi avaliado aos 70 dias após a instalação do experimento.

Seguiu-se a mesma metodologia descrita no Experimento 3.12 para medição da massa da matéria seca.

Os dados dos experimentos, após a análise de variância, foram submetidos ao teste de Tukey à 5% de significância quando o valor de F foi significativo, utilizando-se o pacote estatístico "SANEST" (SARRIÉS et al., 1992). Para a análise dos dados de ocorrência de vitrificação, foi suposto que os dados têm distribuição Bernoulli (caso particular da distribuição Binomial) com probabilidade para transformação logística. O ajuste do modelo foi feito através de uma generalização na análise de regressão para erro binomial (Teoria de Modelos Lineares Generalizados) segundo MCGULLAGH & NELDER (1989) usando-se o programa GLIM (PAYNE, 1986).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito de BAP

É ampla a aplicação da citocinina na Fase 1 e Fase 2 da micropropagação, sendo associado os altos níveis de BAP à morfogênese anormal (ZIV, 1991).

No entanto, os resultados demonstraram que mesmo baixos níveis de BAP foram capazes de promover alto índice de vitrificação. Pela Figura 2, pode-se observar que já a partir da mais baixa concentração de BAP, 60% das plantas desenvolveram a vitrificação que aumentou progressivamente para té 90% na maior concentração da Fase 1.

Mesmo no controle, desenvolveram-se plantas vitrificadas, embora com baixa frequência (20%), sugerindo que outros fatores, além do regulador BAP, estejam envolvidos na morfogênese anormal.

De igual modo, na Fase 2, constatou-se uma relação linear entre as doses de BAP e a frequência da vitrificação, onde no controle desenvolveu-se 15% enquanto a maior dose de 2,0 mg/l de BAP chegou a promover 100% de vitrificação (Figura 3 e Tabela 3).

Os resultados condizem com a literatura revisada onde a citocinina aparece como um dos principais causadores da vitrificação (VON ARNOLD & ERIKSON, 1984 e GASPAR et al., 1987).

Por outro lado, doses elevadas tem garantido rápido desenvolvimento e maior produção de gemas

adventícias via organogênese como foi constatado no cultivo de ápices meristemáticos e explantes nodais de cravo no presente trabalho.

Figura 2 - Efeito do BAP na Taxa de Vitrificação da Fase 1

Tabela 2 - Médias das Notas e Número de Plantas Vitrificadas da Fase 1 Considerando Diferentes Doses de BAP.

Tratamentos (mg/l BAP)	Notas	R.L. de Plantas Vitrificadas
0,0	2,60 Aa	0,3436
0,2	4,80 Bb	0,5079
0,4	4,95 Bb	0,6705
0,6	4,45 Bb	0,8005
0,8	4,30 Bb	0,8878
1,0	5,30 Bb	0,9397
C.V. (%)	33,97	R.L.**

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey ao nível de 5% (maiúsculas) e 1% (minúsculas) de probabilidade. Regressão linear (R.L**) significativa a 1%.

Figura 3 - Efeito do BAP na Taxa de Vitritrificação da Fase 2.

Figura 4 - Efeito do BAP no Desenvolvimento da Fase 1.

Figura 5 - Efeito do BAP na Taxa de Propagação da Fase 2.

Tabela 3 - Médias do N^o de Brotações, Comprimento (Cm) e N^o de Plantas Vitrificadas da Fase 2 Considerando Diferentes Doses de BAP.

Tratamentos (mg/l BAP)	N ^o de Brotações	Comprimento (cm)	R.L de Plantas Vitrificadas
0,0	1,35 Aa	3,25 Aa	0,2604
0,1	3,15 Bab	4,35 Bb	0,3620
0,3	4,90 Cb	3,00 Aac	0,5957
0,5	9,36 Dc	2,27 Ccd	0,7928
1,0	12,61 Ed	1,76 Cd	0,9765
2,0	16,50 Fe	1,71 Cd	0,9998
C.V. (%)	22,75	27,09	R.L.**

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey ao nível de 5% (maiúsculas) e 1% (minúsculas) de probabilidade. Regressão Linear (R.L**) significativa a 1%.

Como pode ser observado na Figura 4, a menor dose de BAP demonstrou-se tão eficiente no

desenvolvimento das plantas da Fase 1 quanto as maiores doses testadas, com todos os tratamentos iguais entre si, mas diferindo do controle (Tabela 2).

Embora baixos níveis de BAP tenham contribuído também na redução da vitrificação da Fase 2, ainda que fracamente, contudo, foram as doses maiores que ofereceram melhor taxa de perfilhamento com 16,5 brotações para a maior dose de 2,0 mg/l e 1,35 brotações para o controle (Figura 5) sendo que todos os tratamentos foram diferentes entre si e do controle (Tabela 3). No entanto, às altas taxas de perfilhamento seguiu-se uma sensível redução no tamanho das brotações (Figura 5 e Tabela 3).

O mecanismo de ação da citocinina no processo da vitrificação é pouco compreendido. Talvez ela poderia induzir uma súbita atividade celular (BORNMAN & VOGELMAN, 1984; KATAEVA, 1991; WILLIAMS & RAJII, 1991) e em um meio com alto potencial hídrico e/ou uma atmosfera de elevada umidade relativa no interior dos frascos, resultaria em novas células que logo se turgiriam.

Certos autores como GASPAR et al. (1987) citam ainda a possibilidade dos reguladores provocarem um estresse com o posterior desencadeamento da síntese de etileno e este hormônio seria, preferencialmente, o responsável pelas alterações observadas na morfogênese anormal ao nível de parede celular.

4.2. Efeito de "Gelrite"

A vitrificação foi observada em várias espécies quando se utilizou meio líquido ou baixa concentração de substância geleificante (ZIV, 1991). Com o aumento na concentração do ágar, tem sido verificado uma redução significativa na vitrificação, embora resultando numa menor taxa de multiplicação e tamanho das gemas.

Tais informações estão, em parte,

condizentes com os resultados obtidos, onde se observou uma relação linear inversa entre concentração de "gelrite" e frequência de vitrificação para a Fase 1 e Fase 2 da micropropagação do cravo.

As concentrações mais baixa de "gelrite" testadas na fase 1 promoveram até 100% de vitrificação, enquanto a maior concentração testada (4,5 g/l) reduziu esse índice para 20% (Figura 6).

Figura 6 - Efeito do "Gelrite" na Taxa de Vitrificação e no Desenvolvimento da Fase 1.

Tabela 4 - Médias das Notas e N^o de Plantas Vitrificadas da Fase 1 Considerando Diferentes Concentrações de "Gelrite".

Tratamentos (g/l "Gelrite")	Notas	R.L. de Plantas Vitrificadas
2,3	4,25 Aa	0,9946
2,7	4,00 Aa	0,9836
3,2	4,00 Aa	0,9369
3,8	5,00 Aa	0,7350
4,5	3,50 Aa	0,2815
C.V. (%)	33,92	R.L **

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey ao nível de 5% (maiúsculas) e 1% (minúsculas) de probabilidade. Regressão Linear (R.L.**) significativa a 1%.

Esperava-se que o aumento da concentração de "gelrite" viesse a comprometer o desenvolvimento das plantas, no entanto, o efeito não foi diagnosticado. Portanto, o desenvolvimento das plantas para todas as concentrações de "gelrite" testadas foram iguais entre si na Fase 1 (Tabela 4)

Da mesma maneira, a tendência observada na Fase 1 com respeito à relação de vitrificação e concentração de "gelrite", também aconteceu na Fase 2. Novamente, verificou-se uma relação linear inversamente proporcional entre níveis de "gelrite" e índice de vitrificação que decaiu de 80%, na menor concentração testada de 2,5 g/l, para 8,4% na maior concentração de 9,0 g/l (Figura 7). Os resultados permitiram determinar o melhor tratamento no controle da vitrificação como sendo as concentrações de 6,0 e 9,0 g/l de "gelrite", diferindo significativamente dos demais tratamentos (Tabela 5).

Figura 7 - Efeito do "Gelrite" na Taxa de Vitrificação da Fase 2.

Figura 8 - Efeito do "Gelrite" na Taxa de Propagação da Fase 2.

Tabela 5 - Médias do N^o de Brotações, Comprimento (Cm) e N^o de Plantas Vitrificadas da Fase 2 Considerando Diferentes Concentrações de "Gelrite".

Tratamentos (g/l "Gelrite")	N ^o de Brotações	Comprimento (cm)	R.L de Plantas Vitrificadas
2,5	10,20 Aa	3,42 ABa	0,6896
3,0	9,40 ABab	3,56 Aa	0,6342
4,0	7,20 BCabc	3,01 Ba	0,5136
6,0	6,50 CDbc	2,14 Cb	0,2813
9,0	4,20 Dd	1,91 Cb	0,0812
C.V.(%)	27,80	23,50	R.L.**

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey ao nível de 5% (maiúsculas) e 1% (minúsculas) de probabilidade. Regressão Linear (R.L.***) significativa a 1%.

Não obstante, concentrações maiores de "gelrite" comprometeram a razão do perfilhamento onde a concentração menor de 2,5 g/l de "gelrite" foi a que proporcionou maior taxa de multiplicação com 10,2 gemas por explante, porém, Número de Número de Número de Número de Número de Número de Número de com 80% de vitrificação, enquanto na concentração de 9,0 g/l essa taxa decaiu para 4,2 gemas por explante, contudo com o menor índice de vitrificação, 8,4% (Figura 7 e 8).

Desse modo, os resultados permitiram eleger a concentração de 2,5 g/l e 9,0 g/l de "gelrite" os melhores e piores tratamentos na taxa de multiplicação, respectivamente.

À medida que se elevou a concentração de "gelrite", houve nítida tendência de redução progressiva do tamanho médio das brotações (Figura 8) com diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 5).

Resultados similares foram obtidos por PASQUALETO et al. (1986) no controle da vitrificação elevando a concentração de "gelrite" para 6,0 g/l; e por DEBERGH et al. (1981), ZIV et al. (1983) e CHOUDHARY (1991) aumentando a concentração de ágar para 11 g/l, porém à esses tratamentos seguiu-se também, considerável redução na taxa de propagação e no tamanho das brotações.

À essas implicações podem ser atribuídas à condição de baixo potencial de água que afeta a disponibilidade de água e substâncias do meio de cultivo, dentre as quais, a citocinina (DEBERGH, 1983 e 1984) que demonstrou ser potente estimulante da vitrificação tanto na Fase 1 quanto na Fase 2 deste trabalho.

De acordo com DEBERGH et al. (1983 e 1984), a promoção da vitrificação por altos níveis de citocinina pode ser contornada elevando a concentração de ágar,

limitando dessa forma, a mobilidade de reguladores sob baixo potencial matricial dado pelas partículas de gel, porém, compromete a taxa de propagação.

Diversos trabalhos constataram que o "gelrite" tem maior ação efetiva na vitrificação que o ágar. O efeito promotor do "gelrite" na vitrificação pode ser atribuído à sua constituição química em ácido urônico e outras impurezas adicionais tais como altos níveis de K^+ e Mg^{++} que podem contribuir para o abaixamento do potencial de água do explante implicando no aumento do potencial osmótico de suas células (PASQUALETO et al. 1986 e 1988).

As medições do potencial de água do meio básico nas variadas concentrações de "gelrite" na Fase 2 e dos explantes foliares e caulinares de plantas normais e vitrificadas estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Medidas dos Potenciais de Água (MPa) em Diferentes Concentrações de "Gelrite" e Explantes Foliares e Caulinares.

% "gelrite"	Ψ (MPa)
0,25	-0,36
0,3	-0,42
0,4	-0,5
0,6	-0,69
0,9	-1,5
Folha Normal	-1,7
Folha Vitrificada	-0,75
Caule Normal	-1,4
Caule Vitrificada	-0,9

MPa = Megapascal

Nota-se uma diminuição do potencial em relação aumento da concentração do "gelrite" obedecendo uma relação inversamente proporcional.

A Tabela 6 mostra também que plantas vitrificadas apresentaram maior conteúdo de água em relação

as plantas normais mediante os valores do potencial de suas folhas e caules que foram maiores nas plantas vitrificadas.

Segundo KEVERS & GASPAR (1986a e b), plantas vitrificadas são caracterizadas por desenvolverem baixa pressão de parede, permitindo a entrada desenfreada de água do meio com elevado potencial de água, gerando células hiperídricas com alto potencial de água. Daí, meios com mais elevados potenciais de água terem estimulado maior índice de vitrificação nos experimentos conduzidos no presente trabalho.

4.3. Estudos Anátomo-Histológicos

O material vitrificado induzido pelas diversas condições nutricionais e físicas testadas no presente trabalho, foi caracterizado pela ausência de dominância apical, folhas longas, entumescidas e translúcidas com necroses apical (Figura 9).

Estudos da anatomia comparativa revelaram sensíveis alterações na organização estrutural do mesófilo e dos tecidos caulinares do material normal e vitrificado como está evidenciado nas Figura 10.

De imediato, percebe-se que a nítida distribuição ordenada, característica dos tecidos parenquimatosos e dos condutores e da epiderme da folha de planta normal (Figura 10A) dá lugar a um padrão morfogênético assinalado pelo alto grau de desorganização do parênquima ao longo do mesofilo, dotado de células volumosas e alongadas, com um acréscimo de grandes espaços intercelulares em folhas de plantas vitrificadas (Figura 10B), causando a impressão de um arranjo paliçádico, inexistente em folhas não vitrificadas do cravo.

Este arranjo caracteriza uma enorme alteração na relação nucleoplasmática (RNP), evidenciando

um maior volume citoplasmático superior ao esperado para este tecido em material normal.

Ainda nas folhas vitrificadas observa-se uma epiderme rudimentar e cutícula irregular. PREECE & SUTTER (1991) tem referido ao baixo nível de cutícula a reduzida taxa de sobrevivência de plantas vitrificadas, quando em condições ex-vitro, mesmo que sejam usadas condições especiais de aclimação como o uso de estufins.

Figura 9 - Aspecto Morfológico de Planta Normal (A) e Planta Vitrificada (B).

Neste material, percebe-se também, a redução dos tecidos condutores limitados a estreitos feixes vasculares. GERSANI et al. (1986) atribuíram a ausência de dominância apical, em plantas vitrificadas, à redução dos tecidos vasculares por onde se daria, preferencialmente, o

transporte de auxinas. Esta baixa capacidade de diferenciação dos tecidos vasculares ainda não está bem compreendido.

As mesmas alterações observadas em folhas vitrificadas, de igual modo, se aplicam em caules vitrificados, caracterizado, histologicamente, por células tipicamente volumosas e de contorno irregular no córtex, apresentando grandes espaços intercelulares e tecidos vasculares reduzidos, limitados a pequenos feixes (Figura 10D), enquanto em caule de plantas normais os tecidos vasculares estão em disposição concêntrica e contínua (Figura 10C).

Os resultados estão condizentes com a literatura consultada, uma vez que desordens nos tecidos vasculares, clorofilianos e de sustentação é citada como o efeito mais pronunciado em diversas espécies suscetíveis à vitrificação como *Castanea sativa* (VIEITEZ et al, 1985), *Dianthus caryophyllus* (WERKER & LESHEM, 1987) e maçã. Neste trabalho Nenhuma alteração foi encontrada na epiderme caulinar.

Figura 10 - Corte Transversal de Folha de Material Normal (A) e Vitrificado (B), e Caule de Material Normal (C) e Vitrificado (D) em aumento 100x.

4.4. Efeito de Sistemas de Vedação

A umidade relativa representa um outro importante fator que está intimamente relacionado à vitrificação, sendo que a redução da umidade tende a reduzir a vitrificação. Alguns tratamentos que podem ser utilizados são o aumento do potencial osmótico através da elevação da concentração de ágar e/ou ainda mudanças no sistema de vedação dos frascos (ZIV, 1991).

Resultados bastante representativos no tocante ao controle da vitrificação foram alcançados ao se trabalhar com esses dois fatores (potencial de água e vedação). Conforme a Figura 11 e Tabela 7, nota-se que a concentração de ágar e o tipo de vedação afetou significativamente o desenvolvimento e o índice de vitrificação das plantas regeneradas na Fase 1.

No entanto, somente no tratamento de 12 g/l de ágar manifestaram-se expressivas diferenças quanto ao desempenho do crescimento das plantas regeneradas para os sistemas de vedação testadas, onde a melhor performance do material se estabeleceu sob condições de tampas de papel alumínio.

Nenhuma variação significativa foi observada quanto ao desenvolvimento (notas) das plantas para os sistemas de vedação analisados em 8 g/l de ágar (Tabela 7).

As combinações "tipos de vedação" e "nível de ágar" contribuíram, satisfatoriamente, na redução da vitrificação. Vedações do tipo tampas de algodão reduziram a frequência da vitrificação em ambas as concentrações, no entanto, na concentração de 12 g/l de ágar verificou-se menor índice da vitrificação, comprometendo, porém o desenvolvimento (Figura 11).

Figura 11 - Efeito de Sistemas de Vedação na Taxa de Vitrificação e no Desenvolvimento da Fase 1.

Tabela 7 - Médias das Notas e N^o de Plantas Vitrificadas da Fase 1 Considerando o Tipo de Vedação e Concentrações de Ágar.

Tratamentos		Notas	R.L. de Plantas Vitrificadas
g/l Ágar	Vedação		
8	Alumínio	3,20 Aa	0,700
8	Algodão	4,00 Aa	0,200
12	Alumínio	4,00 Aa	0,500
12	Algodão	2,00 Bb	0,100
C.V.(%)		43,66	R.L ns

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey ao nível de 5% (maiúsculas) e 1% (minúsculas) de probabilidade. Regressão Linear (R.L.ns) não significativa a 1%.

De acordo com a Tabela 7, os resultados permitiram identificar o melhor tratamento na redução da vitrificação da Fase 1, sem afetar drasticamente o desenvolvimento das plantas, como sendo a concentração de

8 g/l de ágar acoplado ao uso de tampas de algodão.

Esta avaliação ainda demonstrou que os tratamentos que consistem no aumento dos níveis de ágar do meio aliado a substituição de tampas de papel alumínio nos frascos por tampas de algodão inibiram significativamente o desenvolvimento das plantas.

Mais uma vez, o "gelrite" demonstrou seu pronunciado efeito, em relação ao ágar, na promoção da vitrificação da Fase 2 da micropropagação, porém, somente nos frascos selados com papel alumínio (Figura 12). No entanto, meio com "gelrite" aliado à tampas de papel alumínio proporcionaram melhor taxa de propagação e maior comprimento médio das brotações (Figura 13).

Figura 12 - Efeito de Sistemas de Vedação na Taxa de Vitrificação da Fase 2.

De acordo com a Tabela 8, o tipo de vedação e o tipo de gel afetou a taxa de propagação e o comprimento das brotações. Sob as condições de tampas de algodão, a taxa de propagação foi 40% menor em relação aquelas plantas

crescidas sob condições de papel alumínio, e o comprimento decaiu 30% . De igual modo, o ágar reduziu a taxa de propagação para 50% em relação ao uso de "gelrite".

Figura 13 - Efeito de Sistemas de Vedação na Taxa de Propagação da Fase 2.

Tabela 8 - Médias do N^o de Brotções e Comprimento (cm) da Fase 2 Considerando o Tipo de Vedação e o Tipo de gel.

Tratamentos		Brotções (N ^o)	Comprimento (cm)
Vedação	Alumínio	3,8 Aa	3,2 Aa
	Algodão	2,6 Bb	2,3 Bb
Gel	"Gelrite"	4,3 Aa	2,9 Aa
	Ágar	2,2 Bb	2,8 Aa
C.V. (%)		41,59	29,44

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey ao nível de 5% (maiúsculas) e 1% (minúsculas) de probabilidade.

Estes resultados corroboram aqueles de HAKKAART & VESRLUIJS (1983) que também conseguiram reduzir

a vitrificação de cravo a níveis bastante insignificantes ao substituírem tampas de papel alumínio por tampas de algodão, o que aferiu acentuadamente no desenvolvimento das plantas com metade do tamanho daquelas condicionadas nos frascos completamente selados. A causa principal desse efeito pode ser atribuída às perdas de água do meio pela evaporação concedida sob essas condições de baixa umidade, restringindo a disponibilidade de água e nutrientes do meio de cultura.

Para esses autores, não foi possível concluir se a redução da vitrificação poderia ser atribuída a uma relação direta com a baixa umidade ou melhor troca gasosa.

Embora tenha sido verificado em alguns trabalhos um aumento na concentração de etileno em frascos selados, o seu papel na vitrificação é ainda obscuro. Segundo KEVERS et al. (.984); KEVERS & GASPAR (1985a) a presença de etileno parece estar relacionada a uma redução na lignificação da parede celular. Estas mudanças seriam a causa da vitrificação devido ao baixo potencial de pressão de parede que permitiria o aumento descontrolado da absorção de água, produzindo células hiperídricas (KEVERS & GASPAR , 1985a e b ; PHAN & LETOUZE, 1983). Assim, o tipo de vedação estaria envolvido na melhor aeração, permitindo a eliminação do etileno para o meio externo, e não na redução da umidade interna.

Uma vedação total do frasco, além de causar o acúmulo de gases liberados pela cultura, leva à saturação de vapor de água o que diminui o fluxo transpiratório nas culturas, podendo causar deficiência mineral como o Ca^{++} o que leva à necroses apical (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1991).

4.5. Efeito de NH_4NO_3 e CaCl_2

Ao passo que elevados níveis de amônia provaram ser um forte aliado na promoção da vitrificação em diversas espécies estudadas (ZIV, 1991), relação inversa foi constatada por GASPAR et al. (1981) em meios enriquecidos de cálcio para certas espécies lenhosas.

As informações acima citadas condizem perfeitamente com os resultados encontrados e revelados na Tabela 9 e Figura 14A, onde a frequência da vitrificação elevou-se, progressivamente, de acordo como aumento dos níveis de NH_4NO_3 .

Tabela 9 - Médias do N° de Plantas Vitrificadas da Fase 2
Considerando Diferentes Doses de NH_3NO_3 e CaCl_2 .

Tratamentos (mM)		R.L. de Plantas Vitrificadas
NH_4NO_3	0.0	0,1410
	20.6	0,1924
	61.8	0,3341
	130.0	0,6325
CaCl_2	0.0	0,4780
	3.0	0,4187
	9.0	0,3081
	15.0	0,0952
		R.L.*

Regressão Linear (R.L.*) significativa a 5%

Da mesma forma, ZIV et al. (1987) aumentaram a proporção de plantas normais em cultura de crisântemo quando reduziram os níveis de nitrato de amônio ou eliminando-o completamente do meio MS.

Uma tendência inversa com os tratamentos de cálcio está evidenciado na Tabela 9 e Figura 14B onde a dose máxima de 15 mM eliminou parcialmente a vitrificação, enquanto a total suspensão de CaCl_2 elevou este índice para 50%. KREUTNER et al. (1984) também reduziram a vitrificação aumentando os níveis de cálcio no meio.

Figura 14 - Efeito de NH_4NO_3 (A) e de CaCl_2 (B) na Taxa de Vitrificação da Fase 2.

As análises determinaram ainda, o melhor tratamento no controle da vitrificação, como sendo a eliminação total do nitrato de amônio, onde a vitrificação decaiu de 60% na dose de 130 mM para 10% na eliminação total do mesmo. A redução da concentração de nitrogênio na forma amoniacal (NH_4NO_3) tem sido utilizado, efetivamente, como uma medida preventiva no combate à vitrificação, possivelmente em decorrência de seu efeito no decréscimo da lignificação da parede celular. DAGUIN & LETOUZÉ (1986) e LEONHART & KANDELE (1987) observaram um aumento na lignificação da parede celular de ameixa e cactos diminuindo o nível de amônio.

Para os níveis de cálcio, os resultados demonstraram que a dose de 15,0 mM de CaCl_2 pode ser considerada o melhor tratamento no combate à vitrificação (Tabela 9 e Figura 14B).

4.6. Proteína Total Solúvel

Com relação aos níveis de proteínas, os tratamentos de amônio e de cálcio demonstraram um aumento gradual no teor de proteína, atingindo ponto máximo na terceira dose de cada substância testada, isto é, 61,8 mM de NH_4NO_3 e 9,0 mM de CaCl_2 (Figura 15 A e B). Na maior dose aplicada de cada substância (130,0 mM de NH_4NO_3 e 15,0 mM de CaCl_2) observou-se uma queda na concentração de proteína, sendo que para o nitrato de amônia essa queda foi tão drástica que o nível de proteína se posicionou abaixo do tratamento suprimido de nitrato de amônio.

Se bem que a eliminação total do nitrato de amônio tenha proporcionado os mais baixos índices de vitrificação (10%), este tratamento influenciou significativamente no desenvolvimento das plantas, determinado pelo decréscimo do nível de proteína, como pode ser verificado na Figura 15A. Entretanto foi a maior dose

de nitrato de amônio que redundou plantas com o mais baixo índice de desenvolvimento determinado pelo baixo nível de proteína (Fig.15A).

Já para os tratamentos de CaCl_2 , a maior dose (15,0 mM) resultou na máxima redução da vitrificação (10%) e afetou de forma efêmera o desenvolvimento das plantas em função da leve queda do nível de proteína como está evidenciado na Figura 15 B.

Figura 15 - Efeito de Doses de NH_4NO_3 (A) e de CaCl_2 (B) no Nível de Proteína da Fase 2.

Análises bioquímicas revelaram que o conteúdo de proteínas em plantas vitrificadas é superior às plantas normais (LETOUZÉ & DAGUIN, 1983; PHAN & LETOUZÉ, 1983; ZIV et al., 1983). LETOUZÉ & DAGUIN (1983), sugerem que altas concentrações de amônio promovem a conversão de açúcares em compostos nitrogenados como aminoácidos, impedindo a produção de lignina e celulose.

LETOUZÉ & DAGUIN (1983), VIETH et al. (1983) e KEVERS et al (1984) comentaram que a alta concentração de amônio pode levar a um aumento na taxa C/N devido a maior atividade das vias biossintéticas de aminoácidos, ocasionando uma queda na atividade da via das pentoses, fonte de componentes estruturais da parede celular como a lignina e a celulose (Figura 16).

Figura 16 - Glicólise e Ciclo de Krebs.

Confirmando essas observações tem-se constatado uma relação entre aumento da vitrificação e

atividade da glutamato desidrogenase, ocasionada pelas elevadas concentrações amoniacaís do meio (DAGUIM & LETOUZÉ, 1987).

Comparando os níveis de proteínas com as dosagens de cálcio e amônio nas Figuras 15 A e B, observa-se que o cálcio também estimulou a síntese de proteína bem como a amônia, embora em níveis sempre inferiores aos tratamentos de amônio, salvo na última dose. No entanto, esse aumento de proteína nos tratamentos de cálcio não foi acompanhado pelo aumento da vitrificação como foi observado no caso do amônio.

Esse comportamento está ligado ao fato de que o cálcio age como cofator da peroxidase, enzima chave do metabolismo de parede celular, que promove ligações entre polímeros de parede dando firmeza e limitando o alongamento da parede celular por ocasião da entrada da água no citoplasma celular

O cálcio ainda contribui para o aumento da rigidez da parede porque acumula-se na lamela média sob a forma de pectato de cálcio (MALAVOLTA, 1978) e promove ligações iônicas entre os polímeros da parede através de pontes de Ca^{++} . Desse modo, o aumento da síntese de proteína nos tratamentos de cálcio não foi seguido pela vitrificação, pois os altos níveis de cálcio compensariam, atuando diretamente no metabolismo da parede celular, impedindo a baixa resistência da parede (baixa pressão de parede) característica de células de material vitrificado.

4.7. Atividade da Peroxidase

As Figuras 17A e B demonstram uma relação quadrática na atividade da peroxidase para os experimentos efeito de nitrogênio e de cálcio, com o platô localizado nas doses de 20,6 mM de NH_4NO_3 e 9,0 mM de CaCl_2 .

Dessa forma, enquanto doses crescentes de

amônio revelaram-se inibitórias na atividade da peroxidase, efeito inverso foi notado para as doses gradativas de cálcio, salvo a última dose onde se observou uma pronunciada queda na atividade desta enzima.

Figura 17 - Efeito de Doses de NH_4NO_3 (A) e de CaCl_2 (B) na Atividade de Peroxidase.

A atividade da peroxidase está intimamente relacionada à vitrificação (PHAN & LETOUZÉ, 1983; LETOUZÉ & DANGUIN, 1987) como pode ser verificado nos resultados demonstrados na Figura 17 B em que doses elevadas de cálcio proporcionaram um aumento na atividade da peroxidase seguida pela sensível redução da vitrificação, enquanto efeito oposto foi observado para os tratamentos com amônio (Figura 17 A).

Além da peroxidase, outras enzimas tem sua atividade comprometida no processo da vitrificação como a Coa-ligase, hidroxilase, PAL e outras (ROBERTS & MILLER, 1983 e KEVERS et al., 1984). De acordo com FRY (1979) e DAVIES (1990), a peroxidase age realizando ligações do tipo isoditiroxil entre proteínas de parede (extensina) (Figura 18 B) e de difurilato entre polissacarídeos de parede (Figura 18 A) dando maior sustentação às microfibrilas e limitando o alongamento da parede (Figura 19). Portanto, tratamentos estimuladores da atividade da peroxidase, podem controlar a vitrificação como foi constatado nos resultados de tratamentos de cálcio acima descritos.

Por outro lado, demonstrou-se que as peroxidases também catalizam a conversão de fenois solúveis em água à quinonas hidrofóbicas (DAVIES, 1990). Esta reação é confirmada com o relato de que a inibição da peroxidase resulta num decréscimo da hidrofobicidade da parede celular ficando mais suscetível ao efeito da plasticidade promovida pela água e ação das hidrolases promotoras do afrouxamento da parede. Portanto, a hidrofobicidade da parede é um fator limitado pela peroxidase.

Nestes experimentos, constatou-se efeito promotor do cálcio na atividade da peroxidase, e inibitório do amônio. Segundo MALAVOLTA (1980), o cálcio é um vital cofator da peroxidase e este elemento tem a função, ainda, de aumentar a rigidez da parede pela formação de pectato de

cálcio na lamela média da parede celular.

Figura 18 - Ação da Peroxidase nas Ligações de Fibras (A) e Proteínas de Parede(B).

Figura 19 - Estrutura da Parede Celular.

Esperava-se que a cinética enzimática fosse linear ao longo dos tratamentos, porém, para a maior dose de cálcio, onde 90% das plantas desenvolveram-se sem vitrificação, ocorreu uma sensível queda na atividade da peroxidase, contrariando às expectativas.

De acordo com MALAVOLTA (1980), elevados níveis de cálcio podem inibir a absorção de outros íons como o magnésio numa relação antagônica. Por excelência, o magnésio é considerado um importante cofator enzimático de expressiva participação nas vias metabólicas primárias cruciais do desenvolvimento vegetal como a glicólise, ciclo de Krebs e a via das pentoses.

Assim, a maior dose de cálcio pode ter inibido a absorção do Mg^{++} e o déficit desse elemento poderia ter reduzido a atividade do Ciclo de Krebs que além de ser fonte de compostos energéticos, tem ainda a função de fornecer precursores para a biossíntese de proteínas, incluindo aí, a peroxidase.

Mesmo assim, a baixa atividade da peroxidase manifestada na dose de 15 mM de $CaCl_2$ não impediu a redução da vitrificação, uma vez que o elevado nível de cálcio, possivelmente, continuou contribuindo para a formação de pectato de cálcio na lamela média e ligações entre as microfibrilas da parede através de pontes de cálcio, limitando a extensibilidade da parede celular.

Se bem que o possível déficit de Mg^{++} na maior dose de cálcio, pudesse afetar a biossíntese de proteínas, maior dreno da glicose-6-p poderia ser direcionada, preferencialmente, à via das pentoses para a biossíntese de precursores de celulose e lignina. Segundo KEVERS et al, (1984) e VIEITEZ et al. (1985), o baixo nível de celulose e lignina são as maiores causas da vitrificação.

Nas doses elevadas de amônio, a baixa atividade da peroxidase pode ser atribuída à retroinibição

da síntese protéica, e conseqüentemente da peroxidase, Mesmo que este efeito favoreça maior atividade da via das pentoses, a baixa atividade da peroxidase constatada seria ineficiente para realizar as ligações das microfibrilas disponíveis.

4.8. Enraizamento in vitro

Enquanto, o ANA apresentou ação inibitória e AIB efeito promocional do enraizamento, seguindo uma relação progressiva ao aumento das doses dos reguladores, o AIA mostrou uma suposta relação quadrática atingindo o ponto ótimo para a dose de 0,5 mg/l como mostra a Figura 20A. Mesmo assim, a avaliação estatística revelou que todos os tratamentos foram iguais entre si, ou seja, não demonstrou diferenças significativas para os níveis qualitativos e quantitativos dos reguladores testados (Tabela 10), o que permite deduzir que o enraizamento do cravo pode ser obtido sem necessariamente suplementar o meio com regulador.

Este resultado pode representar uma grande vantagem econômica, pois traduz na redução dos custos com a eliminação do uso da auxina na fase de enraizamento.

Comportamento oposto verificou-se para o desenvolvimento da parte aérea, onde todos os tratamentos que promoveram o enraizamento levaram a uma inibição da MMS da parte aérea e vice-versa (Figura 20 B). Mas, mais uma vez, sem diferença significativa para os níveis qualitativos e quantitativos das auxinas utilizadas.

Os dados da Tabela 11 demonstram que o coeficiente da correlação simples entre massa de matéria seca da parte aérea e da raiz não foi significativa para os valores quantitativos das auxinas testadas (Tabela 10).

Figura 20 - Efeito de Reguladores na Massa de Matéria Seca (MMS) de Raiz (A) e de Parte Aérea (B).

Tabela 10 - Médias de Produção de Matéria Seca da Raiz e da Parte Aérea do Enraizamento in vitro, Considerando Diferentes Tipos e Doses de Auxinas.

Tratamentos Regulador	mg/l	Produção de Matéria Seca (mg)	
		Raiz	Parte Aérea
AIA	0,0	4,0 Aa	44,4 Aa
	0,25	4,6 Aa	45,9 Aa
	0,5	5,3 Aa	54,7 Aa
	1,0	4,7 Aa	51,8 Aa
ANA	0,0	4,0 Aa	44,4 Aa
	0,25	3,9 Aa	48,0 Aa
	0,5	2,8 Aa	54,0 Aa
	1,0	2,9 Aa	55,0 Aa
IBA	0,0	4,0 Aa	44,4 Aa
	0,25	4,0 Aa	59,6 Aa
	0,5	4,3 Aa	50,0 Aa
	1,0	4,6 Aa	46,7 Aa
C.V. (%)		40,66	21,83

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey ao nível de 5% (maiúsculas) e 1% (minúsculas) de probabilidade.

Tabela 11 - Resumo dos Coeficientes de Correlação Simples para as Variáveis Produção de Matéria Seca da Parte Aérea e da Raiz Considerando o Efeito de Auxinas no Enraizamento do Cravo in vitro.

Tratamentos	R^2	t
AIA	0,33	1,32 ns
ANA	-0,12	0,45 ns
AIB	-0,07	0,27 ns

Probabilidade do teste t ser não significativo (ns) a 5% para o coeficiente de correlação simples.

4.9. Desenvolvimento em Condições ex-vitro

Para os testes comparativos do desempenho das plantas que foram enraizadas in vitro (com e sem o uso de regulador AIA) e ex-vitro, sendo posteriormente transferidas e aclimatadas em casa de vegetação, os resultados denotam diferença significativa para a massa de matéria seca (MMS) da raiz e da parte aérea e para o comprimento da raiz (Tabela 12), prevalecendo, no entanto, como mais representativo, os tratamentos nos quais as plantas passaram pela fase de enraizamento in vitro (Figura 21 e 22 e Tabela 12).

A Tabela 13 mostra a existência do coeficiente de correlação simples somente para a variável MMS da raiz e da parte aérea para todos os tratamentos aplicados.

Levando em consideração a equivalência defrontada no comprimento da parte aérea dos tratamentos analisados, os resultados demonstraram que a Fase de enraizamento in vitro pode ser desprezada. Logo, as plantas micropropagadas de cravo podem ser aclimatadas e enraizadas diretamente no solo.

Embora os dados da massa de matéria seca (MMS) da parte aérea foram diferentes entre os tratamentos, com os melhores resultados incidindo para os tratamentos cujas plantas passaram pela fase de enraizamento in vitro (Figura 22 e Tabela 12), o enraizamento em condições ex-vitro revelou ser o mais indicado em programas de micropropagação, em razão da redução do tempo, devido a eliminação da Fase de enraizamento in vitro, e a da redução dos custos desejados com a supressão dessa fase.

Outras razões que asseguram o enraizamento em condições ex-vitro é que o enraizamento in vitro oferece algumas desvantagens: a) sistema radicular pode não ser funcional; b) maior probabilidade de contrair doenças

durante o transplântio; c) limitado sistema vascular de conexão entre o caule e a raiz (GROUT & ALSTON, 1977; DEBERGH, 1991 e GRATTAPAGLIA, 1991).

Figura 21 - Efeito de Condições de Enraizamento no Comprimento de Raiz e de Parte Aérea na Aclimação.

Figura 22 - Efeito de Condições de Enraizamento na Produção de Matéria Seca de Raiz e de Parte Aérea na Aclimação.

Tabela 12 - Médias do Comprimento e Produção de Matéria Seca da Raiz e da Parte Aérea da Fase 4 da Micropropagação do Cravo Considerando Diferentes Formas de Enraizamento.

Tratamentos	Comprimento(cm)		Prod. de Matéria Seca(g)	
	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	Raiz
0.5mg/l AIA	17,7 Aa	12,7 Aa	1,13 Aa	0,053 Aa
Sem Regulador	18,1 Aa	11,9 Aa	1,09 Aa	0,052 Aa
<u>Ex-vitro</u>	16,1 Aa	7,8 Bb	0,62 Bb	0,026 Bb
C.V. (%)	12,91	24,55	18,10	24,45

Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey ao nível de 5% (maiúsculas) e 1% (minúsculas) de probabilidade.

Tabela 13 - Resumo dos Coeficientes de Correlação Simples para as Variáveis Comprimentos da Parte Aérea (X1) e da Raiz (X2) e Produção de Matéria Seca da Parte Aérea (X3) e da Raiz (X4) da Fase 4.

Variáveis	R ²	t
X1 e X2	0,10	0,56 ns
X1 e X3	0,48	2,93 ns
X1 e X4	0,32	1,81 ns
X2 e X3	0,11	0,60 ns
X2 e X4	0,26	1,44 ns
X3 e X4	0,86	9,26 *

Probabilidade do teste t ser não significativo (ns) e significativo (*) a 5% para o coeficiente das correlação simples.

Um outro resultado bastante satisfatório demonstrado neste experimento, foi o ótimo desempenho do crescimento das plantas aclimatadas com relação à taxa de

sobrevivência que foi da ordem de 84%. As possíveis causas podem ser atribuídas às condições de baixa umidade durante o cultivo in vitro oferecida pela vedação do tipo tampas de algodão para os frascos, ocasionando baixa umidade relativa (GROUT & ASTON, 1977).

Figura 23 - Comportamento das Plantas Aclimatadas e Enraizadas ex-vitro (A) e in vitro com AIA (B) e in vitro sem regulador (C).

Provavelmente essa nova condição tenha estimulado a síntese de cera epicuticular e maior atividade fotossintética favorecida pelas trocas gasosas toleradas pelo sistema de vedação adotado. Em geral, plantas crescidas in vitro apresentam limitada taxa de fotossíntese que pode ser atribuída, entre outros fatores, à inadequada troca gasosa dos frascos (FUJIWARA et al., 1987 e KOZAI et al., 1987a e b).

Levando em consideração as baixas perdas durante a aclimação (16%), então o enraizamento e aclimação podem ser feitas simultaneamente. Este procedimento pode substancialmente reduzir os custos da micropropagação adicionado à eficiência do sistema de produção, uma vez que o processo de enraizamento in vitro tem sido estimado ser responsável por aproximadamente 35 a 75% do custo total da micropropagação (DEBERGH & MAENE, 1981).

4.10. Considerações Finais

Pelo exposto, os resultados permitiram averiguar o envolvimento de alguns fatores interagindo, simultaneamente no processo da vitrificação, atuando direta e/ou indiretamente na plasticidade e pressão da parede celular, culminando em células volumosas e deformadas típicas da vitrificação (Figura 24).

Diversos trabalhos tem relacionado o etileno ao efeito primário na queda da pressão da parede, agindo de forma controladora na ação de hidrolases de parede e na inibição de enzimas promotoras de ligações fibrilares da parede celular.

De acordo com a literatura consultada, a ação do etileno pode ser controlada alterando o sistema de aeração, potencial hídrico do meio e níveis de reguladores e nutrientes, o que foi constatado no presente trabalho,

onde essas condições modificadas, favoreceram satisfatoriamente, no combate à vitrificação.

Portanto, estudos devem ser direcionados mais intensivamente ao metabolismo do etileno, afim de que seu efeito possa ser contornado, mesmo sob condições nutricionais, de reguladores, de potenciais hídricos e umidade ideais na promoção de melhor taxa de propagação e desenvolvimento mais rápido de plantas, que ora demonstraram serem altamente indutoras da vitrificação, no presente trabalho.

A eliminação do enraizamento in vitro representa uma grande vantagem referente à redução dos custos e do tempo em programas de micropropagação. No entanto, estudos de fisiologia radicular comparativo entre as duas situações de enraizamento in vitro e ex-vitro devem ser conduzidos para conclusões mais precisas.

Como foi constatado, os resultados indicam que as baixas perdas durante a aclimação devem ser atribuído à possível formação de cera epicuticular, resposta normal do movimento estomatal e atividade da rubisco sob as condições de baixa umidade (maior aeração) in vitro.

Portanto, investigações histoquímicas do material micropropagado sob baixa umidade e a utilização de condições estimuladoras da atividade fotossintética in vitro devem ser pesquisadas, para que maior taxa de sobrevivência seja obtida por ocasião da transferência das plantas para condições autotróficas. Seria interessante também, realizar estudos fisiológicos comparativos sobre a aclimação com plantas micropropagadas sob condições de alta e baixa umidade.

Figura 24 - Sinópsse dos Eventos Fisiológicos da Vitrificação.

5 . CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas condições deste trabalho, permitem concluir que:

a) O regulador BAP é um forte indutor da vitrificação já partir de baixos níveis de 0,2 mg/l.

b) O fator qualitativo e quantitativo da substância geleificante demonstrou pronunciado efeito na morfogênese, com o "gelrite" revelando-se potente promotor da vitrificação. Os resultados indicam que baixos potenciais de água, dado pela aumento da concentração do gel, pode reduzir consideravelmente a vitrificação, porém compromete a taxa de propagação.

c) O sistema de vedação também pode contornar a morfogênese anormal, sendo indicado o uso de tampas de algodão (baixa umidade).

d) Fatores nutricionais também estiveram envolvidos no processo da vitrificação, onde doses a partir de 32 mM de NH_4NO_3 demonstraram-se promotoras da vitrificação e doses elevadas de CaCl_2 , inibitória do fenômeno.

e) As alterações celulares observadas parecem estar sob ação direta da peroxidase e tratamentos que estimulam a sua atividade deve contornar o problema.

f) Os resultados permitiram estabelecer um protocolo ideal para a micropropagação do cravo, para controle da vitrificação, constituído de 4,5 g/l de "gelrite" ou 8 g/l de ágar, 0,5 mg/l de ANA, 0,05 mg/l de BAP, doses normais das soluções salinas do meio MS e vedação do tipo tampas de algodão para cultura de ápices meristemáticos. Para a Fase 2, este protocolo deve ser alterado para 0,5 mg/l de BAP, 10,3 mM de NH_4NO_3 e 12 mM de CaCl_2 do meio básico de MS.

g) Com relação ao enraizamento in vitro, esta fase pode dispensar o uso de reguladores vegetais.

h) O enraizamento pode ser conduzido em condições ex-vitro simultaneamente à aclimação, o que representa uma grande economia nos custos e na redução do tempo, devido a supressão da Fase de enraizamento in vitro.

i) A baixa umidade e maior troca gasosa permitidas pelo sistema de vedação do tipo tampas de algodão teve grande contribuição na satisfatória taxa de sobrevivência durante a Fase de aclimação.

j) Baseado no desempenho das plantas durante a aclimação, pode-se concluir que o material enraizado em condições ex-vitro adquiriu características morfológicas apropriadas para suportar as condições ex-vitro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARANCOK, P. Tissue cultures of select species of the genus *Dianthus* L. and their utilization in the protection of Slovak phytogenofund. *Biologia Bratislava*. 46(9): 745-56, 1991.
- BETTI, J.A. Obtenção de material propagativo vegetal testado livre de vírus. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R; MELO, M., ed. *Biotecnologia para produção vegetal*. Piracicaba, FEALQ, 1991. p.145-70.
- BOLETIN ANUAL CEAGESP, São Paulo, p.4. 1972.
- BOLETIN ANUAL CEAGESP, São Paulo, p.106. 1991.
- BORKOWSKA, B. & MICHALCZUK, L. The physiological disorders of sour cherry cultures: necrosis and vitrification. *Acta Horticulturae*, The Hague, 212: 235-7, 1987.
- BORNMAN, C.H. & VOGELMANN, T. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine - induced adventitious bud formation and vitrification in vitro in *Picea abis*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 61: 505-12, 1984.

- BRAINERD, K.E. & FUCHIGAMI, L.H. Acclimatization of aseptically cultured apple plantas to low relative humidity. *Journal of the American for Society Horticultural Science*, St. Joseph, 106: 515-8, 1981.
- BRAINERD, K.E. & FUCHIGAMI, L.H. Stomatal functioning of in vitro and greenhouse apple leaves in darkness, manitol, ABA, and CO₂. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 33: 338-92, 1982.
- BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.H.; KWIATKOWSKI, S.; CLARK, C.S. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured "Pixy" plum grown under different environments. *HortScience*, St. Joseph, 16(2): 173-5, 1981.
- CARDOSO, E.J.B.N. Doenças das plantas ornamentais. In: GALI, F., ed. *Manual de fitopatologia*. São Paulo, Agronômica Ceres , 1980. cap.3.
- CHOUDHARY, M.L. Vegetative propagation of carnation in vitro through multiple shoot development. *Indian Journal of Horticulture*, Bangalore, 48(2): 177-81, 1991.
- CROCOMO, O.J. Plant biotechnology in the agriculture and development in Brasil. In: SIMPÓSIO ANUAL DA ACADEMIA DE CIÊNCIA DE SÃO PAULO, 11., São Paulo, 1986.p.53-71.
- DAGUIN, F. & LETOUZÉ, R. Relations entre hypolignification et état vitreux chez *Salix babylonica* en culture in vitro. Rôle de la nutrition ammoniacale. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 63: 234-66, 1985.

- DAGUIN, F. & LETOUZÉ, R. Ammonium-induced vitrification in cultured tissues. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 66: 94-8, 1986.
- DAGUIN, F. & LETOUZÉ, R. Vitreous plants in vitro: relationship with ammonium content of the nutrient medium. *Acta Horticulturae*, The Hague, 212: 259-61, 1987.
- DAVIES, M.J.; BAKER, R. & HANAN, J.J. Clonal multiplication of carnation by micropropagation. *Journal of the American Society for Horticulture Science*, St. Joseph, 102(4): 48-53, 1977.
- DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: ————, ed. *Plant hormones and their role in plant growth and development*. New York, Kluwer Academic, 1990. p.1-11.
- DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 59: 270-6, 1983.
- DEBERGH, P.C. Recent trends in the application of tissue culture to ornamentals. In: *INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE CULTURE*, edited by. C.E. GREN and others. New York, Alan R. Liss, 1986. v.3, p.389-93.
- DEBERGH, P.C. & MAENE, L.J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 14; 335-45, 1981.

- DEBERGH, P.C. & READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C. & ZIMMERMAN, R.H., ed. Micropropagation:- technology and application. Amsterdam, Kluwer Academic, 1991. p.1-3.
- DEBERGH, P.C.; HARBAOURI, Y. ; LEMEURE, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 53: 181-7, 1981.
- DENCISO, I. Factors influencing vitrification of carnation and conifers. *Acta Horticulturae*, The Hague, 212: 167-75, 1987.
- De PROFT, M.P.; MAENE, L.J.; DEBERGH, P.C. Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 65: 375-9, 1985.
- De PROFT, M.P.; VAN DE BROEK, G.; De GREEF, J.A. Involvement of ethylene on senescence and vitrification of in vitro cultured miniroses. *Acta Horticulturae*, The Hague, 212: 217-21, 1987.
- DONNELLY, D.J. & VIDAVER, W.E. Pigment content and gas exchange of red raspberry in vitro and ex-vitro. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, St. Joseph, 109: 177-81, 1984.
- EARLE, E.D. & LANGHANS, R.W. Carnation propagation from shoot tips cultured in liquid medium. *HortScience*, St. Joseph, 10: 608-10, 1975.

- FERHRMANN, H. & DIMOND, A.E. Peroxidase activity and phytophthora resistance in different organs of the potato plant. *Phytopathology*, Lancaster, 57: 69-72, 1967.
- FRY, S.C. Phenolic components of the primary, cell wall and their possible rôle in the hormonal regulation of growth, *Planta*, Berlin, 146: 343-51, 1979.
- FUCHIGAMI, L.H.; CHENG, T.Y.; SOELDNER, A. Abaxial transpiration and water loss in aseptically cultured plums. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, St. Joseph, 106: 519-22, 1981.
- FUJIWARA, K.; KOZAI, T.; WATANABE, I. Measurement of carbon dioxide gas concentration in stoppered vessels containing tissue cultured plantlets and estimates of net photosynthetic rates of the plantlets. *Journal of Agricultural Meteorology*, Nogyo Kisho, 43: 21-30, 1987.
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; DEBERGH, P.; MAENE, L.; PASQUES, M.; BOXUS, P. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: BONG, J.M. & DURZAN, D.J., ed. *Cell and tissue culture in forestry*. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1984. v.1, p.152-66.
- GERSANI, M.; LESHEM, B. ; SACHS, T. Impaired polarity in abnormal plant development. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, 123: 91-5, 1986.
- GIACOMETTI, D.C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S., ed. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, EMBRAPA/CNPQ, 1990. Pt I, p.19-25.

- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S., ed. Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de plantas. Brasília, EMBRAPA/CNPq, 1990. p.99-169.
- GROUT, B.W.W. Wax development of leaf surfacer of *Brassica oleracea botrytis* cv. Currawon regenerated from meristem culture, *Plant Science Letters*, Limerick, 5:401-05, 1975.
- GROUT, B.W.W. & ASTON, M.J. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture, I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Horticultural Research*, Edinburgh, 17: 1-7, 1977.
- GROUT, B.W.W. & ASTON, M.J. Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. *Annals of Botany*, London, 42; 993-5, 1978.
- GUKASYAN, I.A.; BUTENKO, R.G.; PETOYAN, S.A.; SEVOST'YANOVA, T.A. Morphogenesis of isolated apices of remontant carnation on an artificial medium. *Soviet Plant Physiology*, New York, 24: 130-5, 1977.
- HAKKAART, F.A. & VERSLUIJS, J.M.A. Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures. *Netherlands Journal Pathology*, Wageningen, 89: 47-53, 1983.
- HANDRO, W. & FLOCH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese in vitro. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. ed, Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, EMBRAPA/CNPq, 1990. p.203-12.

HEGEDUS, P. & PHAN, C.T. Activities of 5 enzymes of the phenolic metabolism on root and acclimated vitreous plants in relation with phenolic treatments. *Acta Horticultural*, The Hague, 212: 211-6, 1987.

HOLLINGS, M. & STONE, O.M. Investigation of carnation viruses. I. Carnation mottle. *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, 53: 103-18, 1964.

HOOGENDOORN, C. & SPARNAAIJ, L.D. International developments in production and consumption of carnations. *Acta Horticulturae*, The Hague, 216: 159-64, 1987.

HU, C.Y. & WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., ed. *Handbook of plant cell culture*. New York, Macmillan, 1983. v.1: Techniques for propagation and breeding, p.177-227.

INFORMAÇÃO SEMANAL CACEX, Rio de Janeiro, 17(802). jul. 1982.

INFORMAÇÃO SEMANAL CACEX, Rio de Janeiro, 22(1057). dez. 1987.

IOANNOV, M. Production of carnation plants by shoot tip culture in vitro. *Technical Bulletin Cyprers Agricultural Research Institute*. 117: 8, 1990.

JACOBS, W.P. Auxin as a limiting factor in the differentiation of plant tissue. *Recent Advances in Botany*, Toronto, 8: 786-90, 1961.

- KANAMORIET, T.; KONISHI, S.; TAKAHASHI, E. Inducible formation of glutamate dehydrogenase in rice plant roots by the addition of ammonia to the media. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 26: 1-6, 1972.
- KATAEVA, N.V.; ALEXANDROVA, I.G.; BUTENKO, R.G.; DRAGAVTCEVA, E.V. Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 27(2): 149-54, 1991.
- KEVERS, C. & GASPAR, T. Vitrification of carnation in vitro: changes in ethylene production, ACC level and capacity to convert ACC to ethylene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 4: 215-23, 1985a.
- KEVERS, C. & GASPAR, T. Soluble, membrane and wall peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase, and lignin changes in relation to vitrification of carnation tissues cultured in vitro. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, 118: 41-8, 1985b.
- KEVERS, C. & GASPAR, T. Vitrification of carnation in vitro: changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels. *Physiologie Végétale*, Paris, 24(6): 647-53, 1986.
- KEVERS, C.; COUMANS, M.; COUMANS-GILLÈS, F. ; GASPAR, T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 61: 69-74, 1984.

- KEVERS, C.; PRAT, R.; GASPAR, T. Vitrification of carnation in vitro: changes in cell wall mechanical properties, cellulose and lignin content. *Plant Growth Regulation*, The Hage, 5: 59-66, 1987.
- KEVERS, C.; GOLDBERG, R.; CHU-BA, J.; GASPAR, T. Composition of the walls of stem and leaves of vitrifying carnation. *Biologia Plantarum*, Praha, 30(3): 219-23, 1988.
- KIM, K.W. & KANG, M.S. Studies on the clonal multiplication of carnation by cuttings in vitro. *Journal of Korean Society for Horticultural Science*, Suwon, 27(1): 81-4, 1986.
- KOZAI, T.; IWANAMI, Y.; FUJIWARA, K. Effects of CO₂ enrichment of the plantlet growth during the multiplication stage. *Plant Tissue Culture Letters*, Tokyo, 4: 22-6, 1987a.
- KOZAI, T.; HAYASHII, M.; HIROSAWA, Y.; KODAMA, T.; WATANABE, I. Environmental control for acclimatization of in vitro cultured plantlets (1) Development of the acclimatization unit for accelerating the plantlet growth and the test cultivation. *Journal of Agronomic Meteorology*, Nogyo Kisho, 42:349-58, 1987b.
- LEONHARDT, W. & KANDELER, R. Ethylene accumulation in culture vessels - a reason for vitrification? *Acta Horticulturae*, The Hague, 212: 223-9, 1987.
- LESHEM, B. Carnation plantlets from vitrified plants as a source of somaclonal variation. *HortScience*, St. Joseph, 21(2): 320-1, 1986.

- LESHEM, B. & SACHS, T. Vitrified *Dianthus* - teratomata in vitro due to growth factor imbalance. *Annals of Botany*, London, 56: 613-17, 1985.
- LESHEM, B.; SHALEV, D.P.; IZHAR, S. Cytokinin as an inducer of vitrification in melon. *Annals of Botany*, London, 61: 255-60, 1988a.
- LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Annals of Botany*, London, 62: 271-6, 1988b.
- LETOUZÉ, R. & DAGUIN, F. Manifestation spontanéé et aléatoire d'une croissance anormale en culture in vitro. Recherche de marqueurs métaboliques. *Revue Canadienne Biologie Experimentale*, Montreal, 42: 23-8, 1983.
- LETOUZÉ, R. & DAGUIN, F. Control of vitrification and hypolignification process in *Salix babylonica* cultured in vitro. *Acta Horticulturae*, The Hague, 212: 184-91, 1987.
- LIBÂNIO, R.A. & WITMER, A.H.M. Comparação entre plantas de crisântemo propagadas in vitro e in vivo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 6., Campinas, 1987, p.77.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FAR, A.A.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, Colchester, 193: 265-75, 1951.

- LUBOMSKI, M. & JERZY, M. In vitro propagation of pot carnation from stem internodes. *Acta Horticulturae*, The Hague, 251: 235-40, 1989.
- MAENE, L. & DEBERGH, P. Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting in vivo. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. The Hague, 5: 23-34, 1985.
- MALAVOLTA, E. *Elementos de Nutrição Mineral de Plantas*. São Paulo, Agronômica Ceres, 1980. p.164-8.
- MARÍN, J.A.; GELLA, R.; HERRERO, M. Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. *Annals of Botany*, London, 62: 663-70, 1988.
- MCCULLAGH, P. & NELDER, J.A. *Generalized linear models*. 2.ed. London, Chapman and Hall, 1989. 511p.
- MENGEL, K. & KIRBY, E.A. Magnesium. In: *Principles of plant Nutrition*. International Potash Institute, Berne, 1978. cap.12, p.412-3.
- MÉTRAUX, J.P. Gibberelins and plant cell elongation. In: DAVIES, P.J., ed. *Plant hormones and their role in plant growth and development.*, Dordrecht, Kluwer Academic Publ. 1990. p.296-317.
- MII, M.; BUTATTI, M.; GIMELI, F. Carnation. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BAJAJ, Y.P.S., ed. *Handbook of plant cell culture*. New York, Macmillan, 1990. v.5, cap.12, p.284-318.

- MILLER, R.M.; KAUL, V.; HUTCHINSON, J.F.; RICHARDS, D.
Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus*) from axillary bud explants. *Annals of Botany*, London, 67(1): 35-42, 1991
- MOREL, G. Producing virus-free cymbidiums. *American Orchid Society Bulletin*, Weast Palm Beach, 29: 495-7, 1960
- MOREL, G. Tissue culture: a new means of chonal propagation of orchids. *American Orchid Society Bulletin*, Weast Palm Beach, 33: 473-8, 1964.
- MOREL, G. & MARTIN, C. Guérison de dehlis atteints d,une moladie à virus. *Camp. Rend. Acad. Sci. Paris*, 235: 1324-5, 1952.
- MURASHIGE, T. Plant Propagation through tissue cultures. *Annals Review of Plant Physiology*, Copenhagen, 25: 135-66, 1974.
- MURASHIGE, T. Plant propagation by tissue culture: A practice with unrealized potential.c In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BAJAJ, Y.P.S., ed. *Handbook of plant cell culture, ornamental species*. 1990. v.5, cap.1, p.3-9.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. Arevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 15: 473-97, 1962.
- NITSCH, J.P. & NITSCH, C. Auxin - dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues. I. *American Journal of Botany*, New York, 43: 839-51, 1956.

- ORLIKOWSKA, T. Vitrification problem in the in vitro culture of fruit tree rootstocks. *Acta Horticulturae*, The Hague, 212: 239-44, 1987.
- PAQUES, M. & BOXUS, P. A model to learn vitrification, the rootstock apple M.26 presents results. *Acta Horticulturae*, The Hague, 212: 193-210, 1987a.
- PAQUES, M. & BOXUS, P. Vitrification: a phenomenon related to tissue water content? *Acta Horticulturae*, The Hague, 212: 245-52, 1987b.
- PAQUES, M. & BOXUS, P. Vitrification: review of literature. *Acta Horticulturae*, The Hague, 212: 155-66, 1987c.
- PASQUALETTO, P.L.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of "gala" apple in vitro. *Journal of American Society for Horticultural Science*, St. Joseph. 111(6): 976-80, 1986.
- PASQUALETTO, P.L.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. The influence of cation and gelling agent concentration on vitrification of apple cultivars in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 14: 31-40, 1988.
- PAYNE, C.D. The GLIM system release 3.77; manual. Oxford, Numerical Algorithms Group, 1986. pt.3
- PETRU, E. & LANDA, Z. Organogenesis in isolated carnation plant callus tissue cultivated in vitro. *Biologia Plantarum*, Praha, 16: 450-3, 1974.

- RITCHIE, G.A.; SHORT, K.C.; DAVEY, M.R. In vitro acclimatization of chrysanthemum and sugar beet plantlets by treatment with paclobutrazol and exposure to reduced humidity. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 42(245): 1557-63, 1991.
- ROBERTS, L.W. & MILLER, A.R. Is ethylene involved in xylem differentiation? *Vistas Plant Science*, New Delhi, 6: 1-24, 1983.
- ROEST, S. & BOKELMANN, G.S. Vegetative propagation of carnation in vitro through multiple shoot development. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 14: 357-66, 1981.
- RUGINI, E. ; TARINI, P.; ROSSODIVITA, M.E. Control of shoot vitrification of almond and olive grown in vitro. *Acta Horticulturae*, The Hague, 212: 177-83, 1987.
- SAGAWA, Y. & KUNISAKI, J.T. Micropropagation of floriculture crops. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BAJAJ, Y.P.S., ed. *Handbook of plant cell culture: ornamental species*, 1990. v.5, cap.3, p.25-6.
- SARRIÉS, G.A.; OLIVEIRA, J.C.V.; ALVES, M.C. *Sanest*, (Didática, 6). Piracicaba, 1992.
- SASS, J.E. *Botanical microtechnique*. 2.ed. Iowa State College Press, Iowa, 1951. 228p.
- SHA, I.; MCCOWN, B.H. & PETERSON, L.A. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. *Journal of American Society for Horticultural Science*, St. Joseph, 110: 631-4, 1985.

- SUTTER, E.G. & LANGHANS, R.W. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, St. Joseph, 104(4): 493-6, 1979.
- SUTTER, E. & LANGHANS, R.W. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 60: 2896-902, 1982.
- TAKAYAMA, S. & MISAWA, M. Factors affecting differentiation in vitro, and a mass-propagation scheme for *Begonia x hiemalis*. *Science Horticulturae*, Amsterdam, 16: 65-75, 1982.
- VIEITEZ, A.M.; BALLESTER, A.L.; SAN-JOSÉ, M.C.; VIEITEZ, E. Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated in vitro. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 65: 177-84, 1985.
- VIEITEZ, A.M.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, E.; SAN-JOSÉ, M.C. Vitrification in chestnut shoots regenerated in vitro. *Acta Horticulturae*, The Hague, 212: 231-4, 1987.
- VIETH, J.; MORISSET, C.; LAMAND, M. Histologie de plantules vitreuses de *Pyrus malus* cv. M-26 et de *Pelargonium peltatum* cv. Chester Frank, tissues de la culture in vitro (Etude préliminaires). *Revue Canadienne de Biologie Expérimental*, Montreal, 42: 29-32, 1983.
- Von ARNOLD, S. & ERIKSSON, T. Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* L. Karst. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 3: 257-64, 1984.

- WARDLE J.; DOBBS, E.B.; SHORT, K.C. In vitro acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, St. Joseph, 108: 386-9, 1983.
- WARDLE, K.; QUINLAN, A.; SIMPKINS, I. Absciscic acid and the regulation of water loss in plantlets of *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* regenerated through apical meristem culture. *Annals of Botany*, London, 43: 745-52, 1979.
- WEITZTEIN, H.J. & SOMMER, H.E. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. *American Journal of Botany*, Baltimore, 69: 1579-86, 1982.
- WEITZTEIN, H.J. & SOMMER, H.E. Scanning electron microscopy of in vitro-cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, St. Joseph, 108: 475-80, 1983.
- WERKER, E. & LESHEM, B. Structural changes during vitrification of carnation plantlets. *Annals of Botany*, London, 59: 377-85, 1987.
- WILLIAMS, R.R. & RAJI, A.M. Effect of temperature, gel concentration and cytokinins on vitrification of *Olearia microdisca* (j.M. black) in vitro shoot cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 26(1): 1-6, 1991.

- YOSHII, H. & IMASEKI, H. Regulation of auxin-induced ethylene biosynthesis. Repression of inductive formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase by ethylene. *Plant Cell Physiologie*, Kyoto, 23: 639-49, 1982.
- ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants, In: DEBERGH, P.C. & ZIMMERMAN, R.H., ed. *Micropropagation: technology and application*. Dordrecht, Kluwer Academic Publ., 1991, cap. 4, p.45-69.
- ZIV, M. & GADASI, G. Enhanced embryogenesis and plant regeneration from cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus by activated charcoal in solid/liquid double-layer cultures. *Plant Science*, Lucknow, 47: 115-22, 1986.
- ZIV, M.; MEIR, G. & HALEVY, A.H. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 2(1): 55-60, 1983.
- ZIV, M.; SCHWARTZ, A.; FLEMINGER, D. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated in vitro; implications for hardening. *Plant Science*, Lucknow, 52: 127-34, 1987.
- ZUCHERELLI, G. Moltiplicazione in vitro dei portainnesti chonali del pesco. *Frutticoltura*, Bogna, 41:15-20, 1979.