

LETÍCIA MASCARENHAS PEREIRA BARBOSA

**Caracterização anatômica e bioquímica da hiperidricidade
em morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) e videira (*Vitis
vinifera* x *Vitis rotundifolia*) propagados *in vitro***

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B238c
2006

Barbosa, Letícia Mascarenhas Pereira, 1979-
Caracterização anatômica e bioquímica da hiperidricida-
de em morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) e videira
(*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) propagados *in vitro* /
Letícia Mascarenhas Pereira Barbosa. – Viçosa : UFV,
2006.
xi, 128f. : il. ; 29cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura.
2. Morango - Propagação *in vitro*. 3. Uva - Propagação
in vitro. 4. Plantas - Anatomia. 5. Fisiologia vegetal.
6. Bioquímica. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

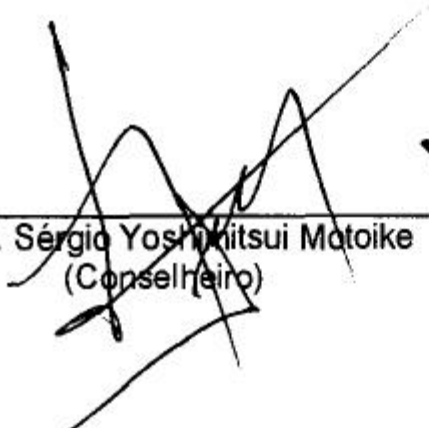
CDD 22.ed. 571.538

LETÍCIA MASCARENHAS PEREIRA BARBOSA

**Caracterização anatômica e bioquímica da hiperidricidade em
morangueiros (*Fragaria x ananassa* Duch.) e videira
(*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) propagados *in vitro***

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

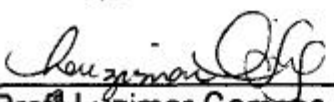
APROVADA: 24 de fevereiro de 2006



Prof. Sérgio Yoshimitsui Motoike
(Conselheiro)




Prof. Fernando Luiz Finger
(Conselheiro)



Prof.ª Lúzimara Campos da Silva



Prof. Paulo Henrique P. Peixoto



Prof. Wagner Campos Ottoni
(Orientador)

Aos meus pais Jair e Judith,

Aos meus irmãos Jardel e Juliane

Aos meus sogros, Paulo e Avani

Dedico.

Ao meu marido, Fabrizioo

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e, em particular, ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realizar o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA – Clima Temperado), na pessoa do Dr. Roberto Pedroso, e ao Professor Luiz Antônio Biasi, pela doação do material vegetal.

Ao Professor Wagner Campos Otoni, pela orientação científica e profissional, pela confiança em mim depositada e pela incansável dedicação e paciência, em todos os momentos.

Ao professor Fernando Luiz Finger, pela colaboração nas análises bioquímicas.

Ao Professor Raimundo dos Santos Barros, pela disponibilidade para as análises de etileno.

À professora Rosane Aguiar e à Dra. Cláudia, pelo carinho, disponibilidade e auxílio nas análises de microscopia eletrônica.

A todos os professores envolvidos direta ou indiretamente na minha formação.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos II: Ana Cláudia, Ana Paula, Elisa, Fabiana, Léo, Lilí, Lourdes, Luciano, Malu, Maure, Rony, Silvano e Takeshi, pela alegre convivência, pela amizade, carinho e disponibilidade em ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, pelos ensinamentos e disponibilidade em ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Pós-colheita, pelos felizes momentos compartilhados.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.

Aos meus colegas e amigos de curso, em especial, Eduardo, Fernanda, Leonardo, Lílian, Luciana, Maria Luiza, Ricardo e Werner, pela

paciência, pelos ensinamentos e pelos momentos de alegria e de mau-humor compartilhados.

Aos meus amigos Adelião, Beno, Cândida, Cláudia, Dai, Fábio e Valdinei, por todos os momentos felizes compartilhados.

Ao meu marido, Fabrizio, pelo amor, incentivo, dedicação e enorme contribuição em todos os momentos.

À minha família, pela confiança, apoio e compreensão durante toda a minha vida.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

LETÍCIA MASCARENHAS PEREIRA BARBOSA, filha de Jair Vieira Pereira e Judith Maria Mascarenhas Pereira, nasceu no dia 12 de julho de 1979 em Pelotas, no Estado do Rio Grande do Sul.

No ano de 2002, concluiu o Curso de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

No ano de 2004, concluiu o Curso de Nutrição, também pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Em março de 2004 iniciou, na Universidade Federal de Viçosa, o Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, submetendo-se à defesa de tese em 24 de fevereiro de 2006.

ÍNDICE

RESUMO	Ix
ABSTRACT	Xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	4
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12

CAPÍTULO I

Efeito do BAP e de agentes gelificantes na ocorrência de hiperidricidade em morangueiros (*Fragaria x ananassa* Duch.) propagados *in vitro*.

RESUMO	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 Análise das características morfológicas da hiperidricidade	23
2.2 Análises ultra-estruturais	23
2.3 Análises bioquímicas	24
2.4 Mensuração da concentração do etileno.....	28
2.5 Análise de clorofila.....	29
3 RESULTADOS	30
3.1 Características morfológicas da hiperidricidade	30
3.2 Análises anatômicas e ultra-estruturais	35
3.3 Análises bioquímicas	39
3.4 Mensuração de etileno	44

3.5 Teor de clorofila	45
4 DISCUSSÃO	46
5 CONCLUSÕES	52
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

CAPÍTULO II

Efeito do BAP e de agentes gelificantes na ocorrência de hiperidricidade em videira (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) propagada *in vitro*.

RESUMO	59
1 INTRODUÇÃO	61
2 MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1 Análise das características morfológicas da hiperidricidade	63
2.2 Análises anatômicas e ultra-estruturais	64
2.3 Análises bioquímicas	65
2.4 Análise de clorofila	68
2.5 Mensuração de etileno nos frascos de cultivo.....	69
3 RESULTADOS	70
3.1 Análise das características morfológicas da hiperidricidade	70
3.2 Análises anatômicas e ultra-estruturais	74
3.3 Análises bioquímicas	78
3.4 Análise de clorofila	80
3.5 Análises de etileno	81
4 DISCUSSÃO	82
5 CONCLUSÕES	82
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

CAPÍTULO III

Influência do tipo de vedação na ocorrência de hiperidricidade em videira (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) e morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) propagados *in vitro*.

RESUMO	93
1 INTRODUÇÃO	95

2 MATERIAL E MÉTODOS	96
2.1 Ocorrência de hiperidricidade nas brotações	97
2.2 Determinação da concentração de etileno produzido no interior dos frascos	98
2.3 Análise da peroxidação de lipídeos	98
2.4 Determinação do extravasamento de eletrólitos	99
2.5 Citometria de fluxo	99
2.6 Análise de isoenzimas	100
2.7 Microscopia eletrônica de varredura	102
2.8 Delineamento estatístico	102
3 RESULTADOS	103
3.1 Tipos de vedação e ocorrência de hiperidricidade nas brotações.....	101
3.2 Determinação da concentração de etileno acumulado e produzido no interior dos frascos	106
3.3 Peroxidação de lipídios	108
3.4 Determinação do extravasamento de eletrólitos	108
3.5 Citometria de fluxo	111
3.6 Análise de isoenzimas	114
3.7 Microscopia eletrônica de varredura	116
4 DISCUSSÃO	118
5 CONCLUSÕES	122
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
CONCLUSÕES GERAIS	128

RESUMO

BARBOSA, Letícia Mascarenhas Pereira, Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006. **Caracterização anatômica e bioquímica da hiperidricidade em morangueiros (*Fragaria x ananassa* Duch.) e videira (*Vitis vinifera* L. x *Vitis rotundifolia*) propagados *in vitro*.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Conselheiros: Fernando Luiz Finger, Luiz Antônio Biasi, Rosane Maria de Aguiar Euclides e Sérgio Yoshimitsui Motoike.

Plantas propagadas *in vitro* são freqüentemente afetadas por condições de estresse que podem levar ao desenvolvimento de hiperidricidade. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivos investigar a influência de agentes gelificantes, da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e do tipo de vedação dos frascos sobre a indução de hiperidricidade em videira e morangueiro. Para tal, foram utilizadas plantas de morangueiros 'Dover' e 'Burkley' e do porta-enxerto de videira 'VR043 – 43', mantidas *in vitro* em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 h e irradiância $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Explantes de morangueiro foram cultivados em meio contendo sais e vitaminas de MS, 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de inositol, acrescido de Ágar ($6,5 \text{ g L}^{-1}$) ou Phytigel® ($2,5 \text{ g L}^{-1}$) e BAP em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0 e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$). Segmentos de entrenós de videira foram transferidos para meio MS meia força ou para meio Q & L, com as mesmas quantidades de sacarose e mio-inositol, acrescidos de Ágar ($6,5 \text{ g L}^{-1}$) ou Phytigel® ($2,5 \text{ g L}^{-1}$) e BAP (1,0 ou $2,0 \text{ mg L}^{-1}$). Foram mensurados os níveis de etileno no interior dos frascos aos 5, 10, 20, e 30 dias de cultivo, para morangueiro, e aos 3, 7, 14, 20, 30 e 40 dias, para videira. Após 35 dias, foram realizadas análises bioquímicas

(SOD, CAT, POD, isoenzimas, peroxidação de lipídios, teor de clorofila), estruturais (microscopia fotônica e eletrônica de varredura), além da análise das características morfológicas da hiperidricidade. Para estudar a influência do tipo de vedação no desenvolvimento de hiperidricidade, plantas de videira e morangueiro foram transferidas para frascos contendo meio indutor e não indutor de hiperidricidade. Os frascos foram vedados com tampa rígida de polipropileno, com e sem membrana permeável a trocas gasosas ou duas camadas de filme plástico de PVC. Foram mensurados os níveis de etileno aos 7, 20 e 40 dias de cultivo e, após 35 dias, foram analisados massas fresca e seca dos brotos, peroxidação de lipídios, sistemas enzimáticos (MDH, ADH e POD), extravasamento de solutos e características ultra-estruturais. A adição de BAP no meio de cultivo induziu ao estresse oxidativo que, por sua vez, causou mudanças no estado fisiológico de plantas de morangueiro e videira, caracterizadas por aumento da atividade de enzimas antioxidantes e da peroxidação de lipídios, alterações em nível celular, malformações de estômatos e de células epidérmicas, além de aumento na produção de etileno no interior dos frascos de cultivo. O tipo de vedação utilizado influenciou o ambiente interno dos frascos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de hiperidricidade. Nos frascos vedados com membrana permeável, mesmo em meio indutor de hiperidricidade, não foram observadas características morfológicas desse fenômeno, embora tenha sido observado aumento da atividade de peroxidases e de extravasamento de eletrólitos em plantas de videira, submetidas a este tratamento. A vedação de frascos com tampa rígida de polipropileno ou com filme de PVC, em presença de BAP, promoveram maior índice de hiperidricidade, confirmando que o tipo de vedação dos frascos, em combinação com componentes do meio e com condições de cultivo, estão relacionados ao surgimento dessa desordem fisiológica em plantas cultivadas *in vitro*.

ABSTRACT

BARBOSA, Letícia Mascarenhas Pereira, Universidade Federal de Viçosa, February 2006. **Anatomical and biochemical characterization of the hyperhydricity in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) and grapevine (*Vitis vinifera* L. x *Vitis rotundifolia*) plants propagated *in vitro*.** Advisor: Wagner Campos Otoni. Committee members: Fernando Luiz Finger, Luiz Antônio Biasi Rosane Maria de Aguiar Euclides and Sérgio Yoshimitsui Motoike.

The plants propagated *in vitro* are usually affected by stress conditions, which can lead to the hyperhydricity development. In this sense, this study was carried out to investigate the influence of the gelling agents, cytokinin-6-benzylaminopurine (BAP) and type of the flask sealing upon the induction of hyperhydricity in grapevine and strawberry plants. So, strawberry plants 'Dover' and 'Burkley' and the rootstock of the grapevine 'VR043 - 43', kept *in vitro* in growth room at 25 ± 2 °C, under a 16-hour photoperiod and irradiance $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Strawberry explants were cultivated in medium containing salts and vitamins of MS, 30 g L^{-1} sucrose, 100 mg L^{-1} myo-inositol added with Agar (6.5 g L^{-1}) or Phytigel® (2.5 g L^{-1}) and BAP at different concentrations (0.5; 1.0; 2.0 and 3.0 mg L^{-1}). Some grapevine internodes were transferred to MS/2 or to Q & L medium, with the same amounts of sucrose and myo-inositol added with Agar (6.5 g L^{-1}) or Phytigel® (2.5 g L^{-1}) and BAP (1.0 or 2.0 mg L^{-1}). The ethylene levels were measured inside the flasks at 5, 10, 20, and 30 days under culture for strawberry plant, as well as at 3, 7, 14, 20, 30 and 40 days for grapevine. After 35 days, the following analyses were accomplished: biochemistry (SOD, CAT, POD, isozymes, lipid peroxidation, chlorophyll content), structural (light microscopy and scanning

electron microscopy), besides the morphologic characteristics of the hyperhydricity. To study the influence of the sealing upon the development of hyperhydricity, the grapevine and strawberry plants were transferred to flasks containing both inductor and noninductor medium of hyperhydricity. The flasks were sealed with either rigid polypropylene lid with and without membrane permeable to gaseous exchanges or two layers of plastic PVC film. The ethylene levels were measured at 7, 20 and 40 days under culture. After 35 days, the following were analyzed: fresh and dry matter of the buds, lipid peroxidation, enzymatic systems MDH, ADH and POD, electrolyte leakage, and ultra-structural characteristics (scanning). The BAP addition to the culture medium induced the oxidative stress, which caused changes in the physiologic state of both strawberry and grapevine plants, that were characterized by increase in either the activity of antioxidant enzymes and the peroxidation of lipids, alterations at cellular level, malformations in stomata and epidermal cells, besides increased production ethylene inside the culture flasks. The sealing type affected the internal ambient of the flasks, therefore the hyperhydricity development. In the flasks sealed with permeable membrane, even in hyperhydricity inducing medium, no morphologic characteristics of such a phenomenon were observed, although an increase in both peroxidase activity and electrolyte leakage were observed in the grapevine plants submitted to this treatment. The sealing of the flasks with rigid polypropylene lid or with PVC film, in presence of BAP, promoted higher hyperhydricity index, therefore confirming that the sealing type of the flasks associated to the components of the medium and culture conditions are related to the appearance of this physiological disorder in plants grown *in vitro*.

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura de tecidos é um conjunto de técnicas utilizadas para manter e desenvolver tecidos e órgãos vegetais, em condições assépticas, ou *in vitro*, possibilitando uma versatilidade de aplicações na biotecnologia vegetal (Hartmann et al., 1997; Dzazio et al., 2002).

No entanto, plantas *in vitro* crescem em pequenos frascos, onde são expostas a sais, carboidratos e reguladores de crescimento em altas concentrações, além de alta umidade relativa e baixa irradiância, o que interfere nos potenciais hídrico e osmótico do meio, bem como nas trocas de CO₂ e O₂ entre o interior dos frascos e o ambiente externo (Ziv, 1995; Fontes et al., 1999; Park et al., 2004). Isto freqüentemente ocasiona o surgimento de desordens que dificultam seu desenvolvimento. Diferentes condições de estresse, tais como, alta umidade, altos níveis de reguladores de crescimento, acúmulo de gases nos recipientes de cultivo e baixa intensidade luminosa levam ao desenvolvimento, nos tecidos cultivados, da desordem morfológica e fisiológica denominada hiperidricidade (Ziv, 1991; Saher et al., 2004).

Este fenômeno, previamente descrito sob o termo vitrificação, apresenta plantas de aspecto translúcido com folhas grossas, frágeis, alongadas e/ou enrugadas, além de caules largos e engrossados em diâmetro, com entrenós mais curtos que os de plantas normais. Seus órgãos são, em geral, menos verdes e facilmente quebráveis. Brotos hiperídricos apresentam menor formação de raízes ou não enraízam e, em geral, não sobrevivem à aclimatização e, quando sobrevivem, originam plantas

malformadas (Debergh et al., 1981; Kevers et al., 1984; Gaspar et al., 1991; Ziv, 1991; Fontes et al., 1999; Kevers et al., 2004).

Alterações anatômicas e bioquímicas são também características deste fenômeno, que é responsável por danos em cerca de 60% dos brotos micropropagados comercialmente (Ziv, 1991; Fontes, 1998; Park et al., 2004;). O problema é distinguir entre estas alterações, aquela que gerou o estado de diferenciação e aquela que é consequência do mesmo (Kevers et al., 2004).

A hiperidricidade pode ocorrer devido a fatores externos, como estado físico e químico do meio e atmosfera de cultivo, em particular, acúmulo de vapor d'água, CO₂ e etileno, independente da origem do explante e, sob condições específicas, evolui para a perda da capacidade regenerativa do tecido (Ziv, 1991; Han et al., 1996; Majada et al., 1997; Park et al., 2004).

Embora sejam bem conhecidas as causas e características morfológicas da hiperidricidade, há muita dificuldade em seu controle e na compreensão das alterações bioquímicas e morfológicas que ocorrem em plantas acometidas por esse fenômeno. Assim, o estudo deste e sua elucidação, visando a paralisação e/ou reversão das alterações que ocorrem durante o desenvolvimento das plantas hiperídricas, são de fundamental importância na cultura de tecidos, para a obtenção de plantas saudáveis.

As principais variedades de morangueiro utilizadas no Brasil provêm dos Estados Unidos, destacando-se a 'Aromas', 'Camarosa', 'Dover', 'Milsei-Tudla', 'Oso Grande' e 'Sweet Charlie', ou dos programas de melhoramento genético da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Clima Temperado – Petotas, RS ('Burkley', 'Santa Clara' e 'Vila Nova') e do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC – Campinas, SP. A variedade 'Burkley' é considerada bastante rústica e destina-se exclusivamente à indústria, ao passo que a 'Dover' possui dupla finalidade – mesa e indústria. Segundo esses autores, embora a metodologia de propagação *in vitro* de morangueiro seja bastante conhecida, poucos estudos enfocam o potencial de multiplicação *in vitro* das variedades, que é importante para o planejamento da produção de matrizes em laboratório.

O porta-enxerto de videira 'VR 043-43', por sua vez, é de ampla utilização na vitivinicultura do sul do país e foi desenvolvido pela Empresa de

Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina - EPAGRI Videira – SC e como atributo maior destaca-se por sua resistência à fusariose (*Fusarium oxysporum* Sch. f.sp. *herbemontis*) e tolerância a margarodes (*Eurhizococcus brasiliensis*) (Borghazan et al., 2003).

Nesse sentido, a propagação *in vitro* desses genótipos tem como contribuição maior atender as demandas de plantas matrizes e de mudas de qualidade genética e fitossanitária comprovadas.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos: estabelecer um protocolo eficiente para obtenção de plantas de morangueiros (*Fragaria x ananassa* Duch. 'Burkley' e 'Dover') e do porta-enxerto de videira híbrido 'VR043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) normais e hiperídricas; investigar as relações entre o etileno e o desenvolvimento de hiperidricidade; caracterizar a organização estrutural e ultra-estrutural de plantas normais e hiperídricas, bem como identificar mudanças subcelulares associadas à hiperidricidade e verificar os efeitos deste fenômeno sobre alguns sistemas metabólicos que controlam a produção e a eliminação de radicais livres e, conseqüentemente, a peroxidação dos lipídios em tecidos dessas espécies.

REVISÃO DE LITERATURA

Durante o cultivo *in vitro*, as plantas são expostas a diferentes condições de estresse que, freqüentemente, leva ao desenvolvimento da desordem morfológica e fisiológica denominada hiperidricidade (Ziv, 1991; Debergh et al., 1992; Ziv, 1995; Saher et al., 2004).

Anatomicamente, brotos hiperídricos apresentam hipertrofia expressiva do parênquima lacunoso, reduzido número de células no parênquima paliçádico, mesofilo com grandes espaços intercelulares, além de baixa lignificação de vasos e traqueídeos, com sistema vascular escasso e carente do arranjo existente nos brotos normais (Pâques e Boxus, 1987; Werker e Leshem, 1987; Ziv, 1991; Han et al., 1992; Franck et al., 1998; Apóstolo e Llorente, 2000; Picoli et al., 2001; Park et al., 2004; Kevers et al., 2004; Chakrabarty et al., 2005).

Alterações como degeneração de cloroplastos, alterações nos estômatos, redução ou ausência de cutícula, com deposição escassa ou irregular de cera epicuticular são também características deste fenômeno (Ziv, 1991; Fontes et al., 1999; Park et al., 2004; Chakrabarty et al., 2005).

Cloroplastos normais apresentam desenvolvimento característico de tilacóides organizados em numerosos grana, enquanto o acúmulo de plastoglóbulos e grãos de amido é atribuído a cloroplastos senescentes, déficit nutricional, tratamento com herbicidas e outras condições de estresse. Porém, em plantas hiperídricas são observadas células com grandes vacúolos, limitado conteúdo citoplasmático e cloroplastos do parênquima paliçádico armazenando volumosos grãos de amido, poucos plastoglóbulos, com membrana interna pouco desenvolvida, tilacóides desorganizados e

baixa densidade de granum (Olmos e Hellín, 1998; Fontes et al., 1999; Louro et al., 1999; Pérez-Tornero et al., 2001; Chakrabarty et al., 2005).

O maior acúmulo de amido em cloroplastos de plântulas hiperídricas pode refletir numa demora na mobilização do açúcar, devido a mudanças na permeabilidade de membrana, causando o acúmulo destes grãos em seu local de síntese. Em plantas hiperídricas de pimenta, a redução do parênquima paliádico, a presença de cloroplastos com grana anormal e estroma com pouca clorofila determinam a baixa taxa fotossintética das folhas, que é um dos principais fatores responsáveis pelo aspecto translúcido das plantas (Olmos e Hellín, 1998; Fontes et al., 1999; Louro et al., 1999; Apóstolo e Llorente, 2000).

Franck et al. (1997) mencionaram que a ocorrência de cloroplastos em número reduzido e menor conteúdo de proteína durante a senescência seriam, provavelmente, decorrentes da autofagia das organelas danificadas nos vacúolos. Estas eliminações autofágicas de cloroplastos levam à diminuição das enzimas de defesa, o que pode ser a causa de progressivas necroses na margem das folhas e ápices caulinares em plantas hiperídricas. Como esses tecidos, geralmente, não recuperam a atividade normal do sistema enzimático de eliminação do peróxido de hidrogênio (ciclo da peroxidase, catalase e ascorbato glutationa) durante a cultura, ocorre acúmulo de H₂O₂ nos brotos hiperídricos, podendo causar mais intensa degeneração de cloroplastos e decréscimo de clorofila.

Diferenças na cutícula de folhas hiperídricas e normais também podem ser observadas. Em *Prunus avium*, folhas normais apresentam cutícula espessa, ondulada e com muitas estrias, enquanto em folhas hiperídricas, uma cutícula fina e lisa é observada (Franck et al., 1997).

A presença de estômatos não funcionais pode ser considerada a maior causa da perda de água e morte dos brotos durante a aclimatização de plantas hiperídricas (Ziv, 1991; Franck et al., 1997). Fontes et al. (1999) observaram células-guarda de plantas hiperídricas de pimentão maiores que em plantas normais, devido à turgescência desenvolvida pelo excesso de absorção de água e a mudanças na estrutura da célula.

Olmos e Hellín (1998), trabalhando com plantas de cravo, observaram anormalidades no tamanho e forma de uma ou ambas as células-guarda e

no fechamento do estômato de plantas hiperídricas, além de estômatos mais circulares que alongados. Também, a densidade estomática foi significativamente maior em plantas normais que em hiperídricas. De acordo com Ziv et al. (1987), o fechamento estomático em plantas hiperídricas não ocorre em resposta a sinais como escuro, ácido abscísico (ABA) ou cálcio, mas devido a modificações na elasticidade celular das células-guarda. Por outro lado, Olmos e Hellin (1998), levando em consideração o fechamento estomático como resultado do transporte de K^+ pelas células-guarda do estômato, concluíram que esse processo pode ser uma consequência da alta concentração de K^+ nestas células.

O potencial osmótico das células-guarda aumenta em resposta ao ABA, indicando que há resposta do estômato ao sinal de fechamento. No entanto, ocorre falha neste fechamento, devido à orientação anormal das microfibrilas de celulose e ao aumento de deposição de calose na célula-guarda hiperídrica (Ziv, 1991).

Entre as características bioquímicas encontradas em plantas hiperídricas, sendo muitas dessas apresentadas como anormalidades morfológicas, podem ser destacadas: (a) reduzida massa seca, com o conteúdo de água essencialmente localizado nos espaços apoplásticos; (b) menor lignificação, que é associada à menor atividade de enzimas envolvidas na síntese de precursores de lignina e em sua polimerização; (c) menos celulose, devido à baixa razão C/N, que favorece a síntese de aminoácidos ao invés das unidades de açúcar de celulose; (d) baixo conteúdo de cálcio, baixas razões Ca^{+2} /ácidos urônicos e ácidos urônicos/açúcares neutros; (e) menos clorofila, o que causa translucidez e, provavelmente, menor capacidade fotossintética; (f) menos fenóis solúveis; (g) alta atividade de peroxidases básicas que, possivelmente, estejam associadas ao aumento do catabolismo de auxina - o transporte polar de auxina é também aparentemente reduzido; h) elevada produção de etileno iniciada em decorrência das condições vitrificantes (Kevers, et al., 2004).

O incremento nos níveis de ferro e de magnésio do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), independente da alteração da concentração do agente gelificante, foi fator importante para evitar a ocorrência de

hiperidricidade na fase de proliferação em cravo, *Dianthus caryophyllus* L. (Yadav et al., 2003).

A principal característica morfológica de plantas hiperídricas está associada ao excesso de água e à deficiência de clorofila (Franck et al., 1997; Gribble et al., 1998). Esse excesso de água nos tecidos hiperídricos pode levar a níveis de saturação, causando hipoxia. A ocorrência de diferentes tipos de estresses resulta na elevação dos níveis de oxigênio ativo (Ziv, 1991; Park et al., 2004). Estes radicais livres, quando não são eliminados rapidamente do metabolismo, podem reagir com ácidos graxos insaturados, causando sua peroxidação na membrana (Scandalios, 1993; Peixoto, 1998).

A peroxidação dos lipídios inicia com a retirada de um átomo de hidrogênio das moléculas de ácidos graxos insaturados, resultando na formação de um dieno conjugado que, ao reagir com oxigênio molecular, produz radicais peroxi-lipídicos e endoperóxidos, podendo resultar na formação de aldeído malônico (MDA) (Buege e Aust, 1978; Gutteridge e Halliwell, 1990; Peixoto, 1998).

Para sobreviver aos efeitos da alta concentração de oxigênio ativo, as plantas dependem da presença de redutores e de enzimas antioxidantes, capazes de remover, neutralizar e/ou eliminar os radicais livres e compostos oxi-intermediários (Scandalios, 1993). Entre as principais enzimas, estão as peroxidases, as catalases e as dismutases do superóxido (Peixoto, 1998). As superóxido dismutases (SODs) são metaloenzimas que catalisam a desproporção de O_2 para H_2O_2 e O_2 . O H_2O_2 produzido pela SOD é, então, removido pela catalase e peroxidases (Saher et al., 2004).

As peroxidases (PODs) são um grupo de isoenzimas que diferem na especificidade pelo substrato, na composição aminoacídica e na sua localização nos tecidos das plantas (Quesada et al., 1990; Peixoto, 1998). Sua atividade é, freqüentemente, aumentada em resposta ao estresse, tendo como principal função a proteção celular contra reações oxidativas (Asada, 1992; Siegel, 1993). Apesar da maior atividade de PODs ácidas estar localizada nas paredes celulares, estas enzimas também estão associadas às membranas, organelas e ao citossol (Gaspar et al., 1985; Siegel, 1993). Também, as PODs básicas podem atacar doadores de

elétrons usando radicais peróxidos livres como substrato e, dessa forma, atuar como agentes de desintoxicação (Gaspar et al., 1985).

Ao contrário das peroxidases do ascorbato (APXs), que possuem alto grau de especificidade para o ácido ascórbico como doador de elétrons, as reações catalisadas por peroxidases do guaiacol (GPXs) são caracterizadas pela baixa especificidade em relação ao composto doador de elétrons, podendo utilizar guaiacol e/ou pirogalol para esse fim (Asada, 1992; Amako et al., 1994; Peixoto, 1998).

As GPXs participam de processos fisiológicos relacionados à lignificação, degradação do AIA e síntese de etileno, entre outros. Já as APXs estão envolvidas em mecanismos de eliminação do H_2O_2 e de hidroperóxidos orgânicos, principalmente nos plastídios, onde a participação das catalases (CATs) é pouco provável (Asada, 1992; Amako et al., 1994).

As catalases (CATs) são oxidoreduases utilizadas em mecanismos enzimáticos primários, para a decomposição do H_2O_2 (Siegel, 1993). São encontradas em glioxissomos e, principalmente, em peroxissomos, onde eliminam o H_2O_2 formado pela oxidação do glicolato na fotorrespiração (Havir e McHale, 1987; Peixoto, 1998). Estas enzimas, assim como as peroxidases são responsáveis pela remoção do H_2O_2 produzido pelas dismutases do superóxido (SODs), resultando na conversão dos radicais O_2^- e H_2O_2 , potencialmente perigosos, em água e oxigênio molecular (Scandalios, 1993; Peixoto, 1998).

A ação das catalases na quebra catalítica do H_2O_2 em água e oxigênio é um caso especial de reação peroxidativa, em que o peróxido serve tanto como substrato quanto como receptor. Esta atividade peroxidativa das CAT, de acordo com Peixoto (1998), indica que as PODs poderiam ser monômeros ou variações da mesma proteína da molécula das CATs. No entanto, os produtos finais da ação das PODs são radicais livres potencialmente tóxicos ao metabolismo celular, enquanto a ação das catalases resulta na produção de oxigênio, espécie química de baixa reatividade (Siegel, 1993; Peixoto, 1998).

As dismutases do superóxido (SODs) são metaloenzimas que catalisam a transformação do radical superóxido (O_2^-) a oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Martinez y Huaman, 1995; Giannopolitis e

Ries, 1977). Nas plantas superiores, coexistem três tipos distintos de SODs, que são classificadas de acordo com o íon metálico presente no sítio ativo em: Cu/ZnSOD, geralmente encontrada no citosol e cloroplastos; MnSOD, na matriz mitocondrial e FeSOD, em cloroplastos (Martinez y Huaman, 1995; Peixoto, 1998).

Os radicais livres são os principais causadores de danos peroxidativos aos componentes celulares. Os radicais O_2^- transformam-se espontaneamente em H_2O_2 , porém a reação é muito mais efetiva se for catalisada pelas SODs. Portanto, as SODs representam a primeira linha de defesa celular, contra a oxidação dos lipídios de membrana (Peixoto, 1998). SODs, CATs e PODs representam importantes enzimas do sistema de defesa das plantas, visto que sua ação conjunta, na presença de substâncias antioxidantes de baixo peso molecular, como o ascorbato, pode efetivamente eliminar, varrer e/ou imobilizar espécies tóxicas de oxigênio. Dessa forma, o aumento da atividade dessas enzimas representa uma forte evidência da produção desses radicais livres (Scandalios, 1993; Siegel, 1993; Foyer et al., 1994; Martinez y Huaman, 1995; Peixoto, 1998).

A hiperidricidade pode ocorrer devido a fatores externos, independente da origem do explante e, sob condições específicas, pode evoluir para a perda da capacidade regenerativa do tecido. Porém, em muitos casos, não é uma anomalia definitiva, uma vez que tecidos hiperídricos podem originar crescimento e morfologia normais (Piqueras et al., 2002; Franck et al., 2004). Isto não significa que folhas hiperídricas, uma vez formadas e maduras, revertam para a estrutura normal e sobrevivam ao transplante, mas sim, que novos brotos ou folhas formadas por brotos hiperídricos, após transferência para um meio não vitrificante ou para casa de vegetação, podem ter anatomia e morfologia aproximada daquelas de plantas normais. Porém, o subcultivo de brotos hiperídricos em condições vitrificantes, pode levar a danos severos, incluindo morte dos brotos, através da necrose clara de todo o meristema primário (Gaspar et al., 1991; Kevers et al., 2004). O estado hiperídrico pode ser mantido através de vários subcultivos sem muitas mudanças, o que pode significar que, uma vez hiperídricos, os brotos, por eles mesmos, encontram um modo de sobreviver (Kevers et al., 2004).

O estado físico e químico do meio e a atmosfera de cultura, em particular, o vapor d'água, CO₂ e etileno, estão associados com a morfogênese anormal dos brotos (Ziv, 1991). Os meios de cultivo são, em geral, líquidos ou semi-sólidos. O aumento da concentração de ágar ou de outro agente gelificante afeta a disponibilidade de água e de vários componentes do meio, em particular, as citocininas, reduzindo a hiperidricidade (Debergh et al., 1981). No entanto, muitas vezes, este fato é acompanhado por decréscimo nas taxas de propagação (Williams e Taji, 1991; Ziv, 1991; Franck et al., 1997; Saher et al., 2005).

Um problema encontrado freqüentemente com Ágar, o principal agente gelificante, é a variação na qualidade e pureza entre as diversas marcas e entre lotes de uma mesma marca. Devido a este problema, pesquisadores têm optado pelo uso do Gelrite, que é um polissacarídeo extracelular complexo produzido por *Pseudomonas elodea*, que contém menos minerais livres que o Ágar. Este agente bacteriano, além de ser mais puro que Ágar, tem sido utilizado devido à baixa quantidade necessária para obter um resultado semelhante ao do Ágar, quanto à solidificação do meio. Porém, a estrutura física do Gelrite parece permitir que os brotos absorvam em maior intensidade substâncias que podem induzir hiperidricidade, como as citocininas, íons de amônia e água e, com isso, causar ou aumentar este fenômeno nos brotos regenerantes (Franck et al., 1997).

Entre os fatores externos promotores da hiperidricidade estão os reguladores de crescimento, em particular, as citocininas, que constituem um grupo de fitoreguladores indispensáveis para a quebra da dominância apical e indução de gemas axilares (Ziv, 1991; Paek e Hahn, 2000). A 6-benzilaminopurina (BAP) é uma citocinina sintética muito utilizada em cultura de tecidos vegetais, por sua alta eficiência na promoção de multiplicação em diversas espécies (Ziv, 1991).

Enquanto o uso de citocinina estimula maior produção de parte aérea, o excesso é tóxico e compromete o desenvolvimento das culturas. A toxidez por citocinina no meio se caracteriza, principalmente, pelo excessivo entufamento e falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento excessivo dos caules e hiperidricidade generalizada, com conseqüente dificuldade na etapa de

enraizamento (Leshem et al., 1988). Estes autores relacionaram o processo de hiperidricidade em culturas de crisântemo e melão com toxidez de BAP. Qi-Guang et al. (1986) observaram que o excesso de BAP inibiu a brotação de gemas, reduziu drasticamente número de partes aéreas por explante e promoveu a formação de calos em culturas de *Castanea mollissima*. Foi demonstrado, ainda, que o BAP afeta a hiperidricidade interagindo com a concentração de Ágar no meio. Segundo Jain et al. (2001), a ausência de reguladores de crescimento no meio de cultivo proporciona o desenvolvimento de maiores freqüências de plantas normais, enquanto o meio suplementado com BAP leva ao desenvolvimento de hiperidricidade. Este fenômeno pode ser controlado, até certo ponto, pela redução ou exclusão do BAP do meio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amako, K.; Chen, G-X.; Asada, K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastidic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. **Plant Cell Physiology**, 33: 497-504, 1994.

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

Asada, K. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, 85(2): 235-241, 1992.

Borghezan, M.; Moraes, L. K. A.; Moreira, F. M.; Silva, A. L. Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38(7): 783-789, 2003.

Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, 52: 302-310, 1978.

Chakrabarty, D.; Park, S. Y.; Ali, M. B.; Shin, K. S.; Paek, K. Y. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. **Tree Physiology**, 26: 377-388, 2005.

Debergh, P.; Harbaoui, Y.; Lemeur, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. **Physiologia Plantarum**, 53:181-187, 1981.

Debergh, P.; Aitken-Christie, J.; Cohen, D.; Grout, B.; Von Arnold, S.; Zimmerman, R.; Ziv, M. Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 30: 135-140, 1992.

Dzazio, P. M.; Biasi, L. A.; Zanette, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420 – A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 24(3): 759-764, 2002.

Fontes, M. A. **Morfogênese *in vitro*, isolamento e cultivo de protoplastos e transformação genética de pimentão (*Capsicum sp.*)**. Viçosa: UFV, 1998. 167p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.

Fontes, M. A.; Otoni, W. C.; Carolino, S. M. B.; Brommonschenkel, S. H.; Fontes, E. P. B.; Fári, M.; Louro, R. P. Hyperhydricity in pepper plants regenerated *in vitro*: involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. **Plant Cell Reports**, 19: 81-87, 1999.

Foyer, C. H.; Lelandais, M.; Kunert, K. J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, 92(4): 696-717, 1994.

Franck, T.; Crévecoeur, M.; Wuest, J.; Greppin, H.; Gaspar, T. Cytological comparison of leaves and stems of *Prunus avium* L. shoots cultured on a solid medium with Ágar or gelrite. **Biotechniques and Histochemistry**, 73: 32-43, 1997.

Franck, T.; Kevers, C.; Gaspar, T.; Dommès, J.; Deby, C.; Greimers R.; Serteyn, D.; Deby-Dupont, G. Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response. **Plant Physiology and Biochemistry**, 42: 519-527, 2004.

Franck, T.; Kevers, C.; Penel, C.; Greppin, H.; Hausman, J. F.; Gaspar, T. Reducing properties and markers of lipid peroxidation in normal and hyperhydrating shoots of *Prunus avium* L, **Journal of Plant Physiology**, 153: 339-346, 1998.

Gaspar, T.; Hagège, D.; Kevers, C.; Penel, C.; Crèvecoeur, M.; Engelmann, I.; Greppin, H.; Foidart, J. M. When plant teratomas turn into cancers in the absence of pathogens. **Physiologia Plantarum**, 83: 696-701, 1991.

Gaspar, T.; Penel, C.; Castillo, F. J.; Greppin, H. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Physiologia Plantarum**, 64(3): 418-423, 1985.

Giannopolitis, C. N.; Ries, S. K. Superoxide dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59(2): 309-314, 1977.

Gribble, K.; Tingle, J.; Sarafis, V.; Heaton, A.; Holford, P. Position of water in vitrified plants visualized by NMR imaging. **Protoplasma**, 201:110-114, 1998.

Gutteridge, J. M. C.; Halliwell, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **TIBS**, 15: 129-135, 1990.

Han, B. H.; Joung, H. Y.; Choi, J. K.; Paek, K. Y. Effects of sealing materials and relative humidity of culture vessels on growth, vitrification and nutrient contents in *in vitro* plantlets of *Gypsophila paniculata* 'Bristol Fairy'. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, 36: 886-892, 1996.

Han, B. H.; Paek, K. Y.; Choi, J. K. Structural characteristics of vitrified and glaucous plantlets in *Gypsophila paniculata* L. *in vitro*. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, 33: 177-189, 1992.

Hartmann, H. T.; Kester, D. E.; Davies, F. T. J.; Geneve, R. L. **Plant propagation – principles and practices**. New Jersey: Upper Saddle River, 770p. 1997.

Havir, E. A.; McHale, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 84 (2): 450-455, 1987.

Jain, A.; Kantia, A.; Kothari, S. L. De novo differentiation of shoot buds from leaf-callus of *Dianthus caryophyllus* L. and control of hyperhydricity. **Scientia Horticulturae**, 87: 319-326, 2001.

Kevers, C.; Coumans, M.; Coumans-Gilles, M. F.; Gaspar, T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, 61: 69-74, 1984.

Kevers, C.; Franck, T.; Strasser, R. J.; Dommès, J.; Gaspar, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 77: 181-191, 2004.

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

Louro, R. P.; dos Santos, A. V.; Machado, R. D. Ultrastructure *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* L. shoots cultivated *in vitro* in multiplication and elongation-rooting media. **International Journal of Plant Sciences**, 160: 217-227, 1999.

Majada, J. P.; Fal, M. A.; Sánchez-Tamés, R. The effect of ventilation rate on proliferation and hyperhydricity of *Dianthus caryophyllus* L. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 33: 62-69, 1997.

Martinez y Huaman, C. A. **Efeitos dos estresses hídrico, luminoso e oxidativo em diferentes espécies de batata (*Solanum* spp.)**. Viçosa: UFV, 1995. 122 p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.

Olmos, E.; Hellin, E. Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation shoots. **Scientia Horticulturae**, 75: 91-101, 1998.

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

Paquês, M.; Boxus, Ph. A model to learn “vitrification”, the rootstock apple M.26 present results. **Acta Horticulturae**, 212:193-210, 1987.

Park, S. W.; Jeon, J. H.; Kim, H. S.; Park, Y. M.; Aswath, C.; Joung, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, 99: 199-205, 2004.

Peixoto, P. H. P. **Peroxidação de lipídios em membranas e tecidos de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) com tolerância diferencial ao alumínio**. Viçosa: UFV, 1998. 112 p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.

Pérez-Tornero, O.; Egea, L.; Olmos, E.; Burgos, L. Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, 37: 250-254, 2001.

Picoli, E. A. T.; Otoni, W. C.; Figueira, M. L., Carolino, S. M. B.; Almeida, R. S.; Silva, E. A. M.; Carvalho, C. R.; Fontes, E. P. B. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). **Plant Science**, 160: 857-868, 2001.

Piqueras, A.; Cortina, M.; Serna, M. D.; Casas, J. L. Polyamines and hyperhydricity in micropropagated carnation shoots. **Plant Science**, 162: 671-678, 2002.

Qi-guang, Y.; Read, P. E.; Fellman, C. D.; Hosier, M. A. Effect of cytokinin, IBA, and rooting regime on Chinese chestnut cultured *in vitro*. **HortScience**, 21: 133-134, 1986.

Quesada, M. A.; Tigier, H. A.; Bukovac, M. J., Valpuesta, V. Purification of an anionic isoperoxidase from peach seeds and its immunological comparison with other anionic isoperoxidases. **Physiologia Plantarum**, 79(4): 623-628, 1990.

Saher, S.; Piqueras, A.; Hellín, E.; Olmos, E. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, 120: 152-161, 2004.

Saher, S.; Piqueras, A.; Hellín, E.; Olmos, E. Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: implications of oxidative stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 81: 149-158, 2005.

Scandalios, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, 101(1): 7-12, 1993.

Siegel, B. Z. Plant peroxidase - an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, 12: 303-312, 1993.

Werker, E.; Leshem, B. Structural changes during vitrification of carnation plantlets. **Annals of Botany**, 59: 377-385, 1987.

Williams, R. R.; Taji, 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**, 26: 1-6, 1991.

Yadav, M. K.; Gaur, A. K.; Garg, G. K. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 72: 153-156, 2003.

Ziv, M.; Achwertz, A.; Fleminger, D. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. **Plant Science**, 52: 127-134, 1987.

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

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

CAPÍTULO I

Efeito do BAP e de agentes gelificantes na ocorrência de hiperidricidade em morangueiros (*Fragaria x ananassa* Duch.) propagados *in vitro*

RESUMO

A propagação *in vitro* do morangueiro tornou-se uma prática eficaz para a produção em larga escala de plantas com sanidade controlada. No entanto, plantas propagadas *in vitro* são freqüentemente afetadas por condições de estresse que levam ao desenvolvimento de hiperidricidade. Com o objetivo de otimizar a propagação *in vitro* de morangueiros 'Dover' e 'Burkley' (*Fragaria x ananassa*), com ênfase particular nos fatores envolvidos na hiperidricidade e na capacidade de multiplicação, e determinar o padrão de acúmulo de etileno no interior de frascos de cultivo no desenvolvimento de plantas normais e hiperídricas, plantas mantidas *in vitro* em meio contendo os sais básicos de MS, suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP foram individualizadas e transferidas para o mesmo meio, acrescido de Ágar (6,5 g L⁻¹) ou Phytigel[®] (Sigma Chem, Co, USA) a 2,5 g L⁻¹ e BAP em diferentes concentrações (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹). Foram mensurados os níveis de etileno aos 5, 10, 20 e 35 dias e, ao final do experimento, foram realizadas análises bioquímicas (SOD, CAT, POD, isoenzimas, peroxidação de lipídios, teor de clorofila) e anatômicas (microscopia fotônica e eletrônica de varredura), além da análise das características morfológicas da hiperidricidade. A análise dos dados mostrou que: a) o aumento da concentração de citocinina incrementou a freqüência de hiperidricidade nas duas variedades estudadas; b) nas concentrações até 2,0 mg L⁻¹ de BAP, a substituição de Ágar por Phytigel[®] induziu maior formação de brotos hiperídricos; c) a adição de BAP no meio de cultivo induziu ao estresse oxidativo, caracterizado por aumento da atividade de enzimas antioxidantes, da peroxidação de lipídios e no acúmulo de etileno no interior dos frascos de cultivo, além de alterações em nível celular, como malformações de estômatos e de células epidérmicas; d) o meio de cultivo com 0,5 mg L⁻¹ de BAP e solidificado com Ágar promoveu menores percentagens de hiperidricidade, não reduzindo a taxa de multiplicação dos explantes.

CHAPTER I

Effects from BAP and gelling agents on the hyperhydricity occurrence in strawberry plants (*Fragaria x ananassa* Duch.) propagated *in vitro*

SUMMARY

The *in vitro* propagation of the strawberry plant became an effective practice for the large-scale production of plants with controlled sanity. However, plants propagated *in vitro* are frequently affected by stress conditions that can lead to the development of hyperhydricity. So, this study was carried out to optimize the *in vitro* propagation of both 'Dover' and 'Burkley' strawberry plant (*Fragaria x ananassa*), by particularly emphasizing the factors involved into hyperhydricity and multiplication capacity, as well as to determine the ethylene accumulation pattern in the culture flasks in the development of normal and hyperhydric plants, some plants maintained *in vitro* in MS medium, supplemented with 1.0 mg L⁻¹ BAP were individualized and transferred to the same medium added with Agar (6.5 g L⁻¹) or Phytigel[®] (Sigma Chem, Co, USA) at 2.5 g L⁻¹ and BAP at different concentrations (0; 0.5; 1.0; 2.0 and 3.0 mg L⁻¹). The ethylene levels were measured at 5, 10, 20, and 35 days. At the end of the experiment, the biochemical analyses (SOD, CAT, POD, isozymes, lipid peroxidation, chlorophyll content) and anatomical ones (light microscopy and scanning electronic microscopy) were accomplished, besides the analysis of the morphologic hyperhydricity characteristics. The analysis of the data showed: a) the increase in the cytokinin concentration increased the frequency of the hyperhydricity both varieties; b) at concentrations up to 2.0 mg L⁻¹ BAP, the substitution of Agar by Phytigel[®] induced higher formation of hyperhydric shoots; c) the addition of BAP to the culture medium induced the oxidative stress, that is characterized by increased antioxidant activity and increased peroxidation of lipids, as well as alterations at cellular level such as malformation of either stomata and epidermal cells, and increase in the accumulation of ethylene in the culture flasks; and (d) the culture medium containing 0.5 mg L⁻¹ BAP and solidified with Agar promoted lower hyperhydricity percentages.

1 INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma planta herbácea, rasteira e perene, com propagação vegetativa através de estolhos, que se originam na planta-mãe e enraízam em condições de fotoperíodo longo e temperatura elevada, formando novas plantas (Calvete et al., 2002).

A propagação *in vitro* dessa cultura tornou-se uma prática eficaz para a produção em larga escala de plantas com sanidade controlada e para a preservação de cultivares indefinidamente (Flores et al., 1998). No entanto, durante o cultivo *in vitro*, as plantas crescem sob condições especiais, como redução das trocas gasosas, alta umidade do ar, baixa intensidade luminosa e uso de açúcar como fonte de energia. Estas condições podem causar maior acúmulo de reservas ou biomassa, inibição da fotossíntese, desenvolvimento anormal de estômatos, que levam ao desenvolvimento de hiperidricidade, dificultando a micropropagação e a aclimatização, proporcionando perdas significativas de plantas na transferência para as condições *ex vitro* (Sciutti e Morini, 1993; Pospíšilová et al., 1999).

Plantas hiperídricas possuem aspecto translúcido com folhas espessas, frágeis, muito alongadas e enroladas ou enrugadas, além de caules engrossados, com entrenós mais curtos que os de plantas normais. A hiperidricidade, apesar de ser um fenômeno bastante estudado, não é previsível, podendo ocorrer devido a fatores externos, independente da origem do explante e, sob condições específicas, evolui para a perda da capacidade regenerativa do tecido (Piqueras et al., 2002; Olmos e Hellin, 1998).

O aumento da concentração de ágar ou de outro agente gelificante reduz a disponibilidade de água e de vários componentes do meio, em particular, as citocininas, reduzindo a hiperidricidade (Bornman e Vogelmann, 1984). No entanto, muitas vezes, este fato é acompanhado por decréscimo nas taxas de propagação (Williams e Taji, 1991; Franck et al., 1997). O desenvolvimento de hiperidricidade também é afetado pelo acúmulo de etileno no interior do recipiente de cultura (Park et al., 2004).

Os objetivos deste trabalho foram otimizar a propagação *in vitro* das variedades 'Dover' e 'Burkley' de morangueiro (*Fragaria x ananassa*), com

ênfase particular nos fatores envolvidos na hiperidricidade e na capacidade de multiplicação e determinar o padrão de acúmulo de etileno no interior de frascos de cultivo e sua influência no desenvolvimento de plantas normais e hiperídricas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Nos experimentos, utilizaram-se as variedades ‘Dover’ e ‘Burkley’ de morangueiro (*Fragaria x ananassa*), procedentes do Laboratório de Cultura de Tecidos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Clima Temperado - Pelotas/RS. As plantas foram mantidas *in vitro* em sala de crescimento a 26 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 h e irradiância $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2 lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil), mediante subcultivos mensais em meio com sais e vitaminas de MS acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, $6,5 \text{ g L}^{-1}$ de Ágar (Merck, Alemanha) e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.

A fim de determinar as melhores condições de cultivo para obtenção de plantas normais e hiperídricas, as plantas foram individualizadas, sob condições assépticas, e transferidas para frascos de vidro (240 mL de capacidade) contendo 30 mL de meio MS, com as mesmas concentrações de sacarose e mio-inositol e acrescido dos agentes gelificantes, Ágar (Merck, Alemanha) a $6,5 \text{ g L}^{-1}$ ou Phytigel® (Sigma Chemical Company EUA) a $2,5 \text{ g L}^{-1}$ e BAP em diferentes concentrações. Os meios correspondentes aos tratamentos T1, T3, T5, T7 e T9 receberam as concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, e foram solidificados com Ágar, ao passo que os tratamentos T2, T4, T6, T8 e T10, nas mesmas concentrações de BAP, foram solidificados com Phytigel® (Quadro 1). Os frascos foram tampados com filme plástico transparente de policloreto de vinila – PVC (Goodyear, Brasil) sendo as culturas, acondicionadas em sala de crescimento.

A unidade experimental foi composta por 1 frasco com 5 ramos cada. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 10 tratamentos e 5 repetições por tratamento, para cada variedade,

sendo os dados analisados pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey, a 5 % de probabilidade.

A cada 3 dias, após a primeira semana de cultivo, foram feitas avaliações quanto ao surgimento de características morfológicas de hiperidricidade. Após 35 dias de cultivo, foram coletadas amostras para as análises anatômicas, ultra-estruturais e bioquímicas, assim como para determinação de etileno e de clorofila.

Quadro 1. Diferentes combinações de BAP e de agentes gelificantes utilizados na regeneração de morangueiro (*Fragaria ananassa*)

Tratamentos	BAP (mg L ⁻¹)	Agente gelificante
T1	0,0	Ágar
T2	0,0	Phytigel
T3	0,5	Ágar
T4	0,5	Phytigel
T5	1,0	Ágar
T6	1,0	Phytigel
T7	2,0	Ágar
T8	2,0	Phytigel
T9	3,0	Ágar
T10	3,0	Phytigel

2.1 Análise das características morfológicas da hiperidricidade

Foram avaliados o número de brotos formados por explante e o percentual de hiperidricidade a cada 3 dias, a partir da primeira semana até 35 dias de cultivo.

2.2 Análises estruturais e ultra-estruturais

Para as análises estruturais e ultra-estruturais, foram empregadas lâminas foliares completamente expandidas, as quais foram fixadas de acordo com Karnovsky (1965).

As amostras destinadas às análises de microscopia fotônica foram, em seguida, submetidas a vácuo por 24 horas e lavadas na solução-tampão fosfato de potássio 0,05M por 30 minutos. Após, foram desidratadas em série etílica, emblocadas em historresina e polimerizadas por 15 horas a 70 °C. Os exemplares foram cortados a 60 nm de espessura com navalha de aço descartável em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 – Leica). Os cortes foram corados com azul de toluidina em meio ácido e as lâminas, montadas em resina sintética Permount. As observações foram realizadas em fotomicroscópio (Modelo AX70TRF, Olympus optical, Tokyo, Japão) equipado com sistema U-photo (Olympus, Japão), localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Biologia Vegetal – UFV.

As amostras destinadas à microscopia eletrônica de varredura foram desidratadas em série etílica, até álcool absoluto. Após, foram submetidas à secagem em ponto crítico com CO₂ líquido (Bozzolla e Russel, 1992), utilizando equipamento Balzers (Modelo CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), fixadas em “stubs” e submetidas à deposição metálica com ouro, por pulverização catódica em equipamento Balzers de congelamento a seco (Modelo FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) acoplado ao conjunto de pulverização catódica (Modelo SCA 010). As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (Modelo 1430VP, LEO), instalado no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

2.3 Análises Bioquímicas

O extrato enzimático bruto para a determinação da atividade de peroxidase, catalase e dismutase do superóxido foi obtido pela homogeneização de 0,5 g de tecidos da parte aérea (congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C) com 4 mL de solução de extração (EDTA 0,1 mM em tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8), em almofariz de porcelana. Os fragmentos de células foram removidos por centrifugação a 12000g por 20 minutos, utilizando o sobrenadante como fonte de proteínas, de acordo com metodologia descrita por Saher et al. (2004). Todas as etapas necessárias ao processo foram executadas a 4 °C.

Peroxidase (POD EC1.11.1.7)

A atividade de PODs nos tecidos foliares foi determinada espectrofotometricamente a 25 °C, pelo aumento da absorbância a 470 nm, a partir da reação de 100 µL do extrato enzimático bruto diluído a 1:4 (v/v) com água desionizada em uma mistura de reação contendo 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5, 0,5 mL de guaiacol e 0,4 mL de H₂O₂ 0,59 M, em um volume total de 3 mL (Chance e Maehley, 1955). Os resultados foram expressos em mmoles de POD min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Catalase (CAT EC1.11.1.6)

A atividade das CATs nos tecidos foi determinada após a adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,9 ml do meio de reação constituído de 500 µL de H₂O₂ 59 mM, 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0 e 400 µL de água desionizada a 30 °C (Havir e McHale, 1987). A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm e expressa em mmoles de CAT min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Dismutase do Superóxido (SOD EC1.15.1.1)

À mistura de reação, constituída de 0,3 mL de metionina 130 µM, 0,1 mL de azul de p-nitrotetrazólio (NBT) 2250 µM, 0,1 mL de EDTA 3 µM, 0,2 mL de riboflavina, 0,75 mL de água desionizada e 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM em pH 7,8 (Del Longo et al., 1993), adicionaram-se 100 µL do extrato enzimático bruto. A reação foi conduzida a 25 °C, em tubos de ensaio dispostos em orifícios equidistantes de uma lâmpada fluorescente de 15 W, colocada no centro de uma câmara de incubação circular e foi iniciada pela ligação da lâmpada fluorescente. Após 15 min, o desligamento da lâmpada interrompeu a reação, sendo a produção de formazana azul medida pela determinação do incremento na absorbância a 560 nm, que foi subtraído de um “branco”, no qual não havia extrato enzimático. Nestas condições, uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Giannopolitis e Ries, 1977; Totola, 1998).

Quantificação de proteínas

As determinações da quantidade de proteína presente nos referidos extratos foram feitas pelo método de Bradford (1976), usando Soroalbumina Bovina (BSA) como padrão.

Peroxidação de lipídeos

A peroxidação dos lipídios foi medida pela determinação da quantidade formada de malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação dos lipídios, utilizando-se o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por Buege e Aust (1978). Tecidos da parte aérea pesando 100 mg foram homogeneizados em 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) em almofariz de porcelana, na presença de polivinilpolipirrolidona (PVPP) na proporção de 1:1,5 (PMF:PVPP). O homogenato foi centrifugado por 30 minutos a 4000 g. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4°C. Em seguida, alíquotas de 1 ml dos sobrenadantes foram adicionadas a 4 ml da mistura contendo 10% (p/v) de TCA (ácido tricloroacético) e 0,5% (p/v) de TBA (ácido tiobarbitúrico), contendo 0,01% (p/v) de BHT (butilhidroxitolueno). Os tubos de ensaio foram fechados e incubados em banho-maria por 15 minutos a 95 °C, sob agitação. A reação foi interrompida pela transferência dos tubos de ensaio para banho de gelo. A absorbância dos sobrenadantes foi lida a 535 e 600 nm. A quantidade formada do complexo MDA-TBA foi determinada utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Dhindsa et al., 1981).

Isoenzimas

Para análise isoenzimática, foram utilizadas amostras de folhas normais e hiperídricas previamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C. Para a extração, cerca de 100 mg de tecido para cada mL de solução-tampão foram macerados utilizando almofariz e pistilo, previamente congelados e mantidos sobre barras de gelo (Arimura, 1997).

Os sistemas isoenzimáticos foram caracterizados pela técnica de eletroforese horizontal em géis de amido de milho a 12% em solução tampão (Conkle et al., 1982).

No preparo do gel, foram empregados 350 mL de solução-tampão, dos quais 80 mL foram vertidos em um balão volumétrico de 1000 mL e levados à fervura em fogo brando. Imediatamente após a fervura, o conteúdo do balão volumétrico foi vertido no erlenmeyer e este retornado à chama, para o cozimento do amido. Em seguida, o conteúdo do Erlenmeyer foi vertido em uma forma de acrílico (17,0 x 14,0 x 1,0 cm) sobre a qual se colocou uma placa de vidro pré-aquecida a 60 °C, com a finalidade de se uniformizar a superfície do gel. Os géis foram preparados à tarde e deixados à temperatura ambiente até a manhã do dia seguinte. Em seguida, foram resfriados a 4 °C por uma hora em câmara fria, antes da condução da eletroforese.

Para aplicação das amostras e corrida eletroforética, retirou-se a placa de vidro e, a cerca de 2,5 cm da extremidade, fez-se um corte perpendicular, afastando a menor porção do gel. O tecido vegetal macerado em solução tampão foi aplicado em uma tira de papel cromatográfico Whatman 3 MM (12 x 5 mm), com auxílio de uma pinça, para absorção do filtrado. As amostras absorvidas pelas tiras de papel foram colocadas ao longo da face cortada do gel maior, cobrindo completamente a espessura do gel. Aplicou-se a solução de azul de bromofenol em tira própria, para monitorar a migração. Em seguida, foi apoiado o suporte do gel sobre as cubas, conectando-se o gel às cubas dos eletrodos, mediante uma ponte de pano tipo Perfex previamente embebida na solução tampão específica para cada sistema enzimático.

Fez-se uma pré-corrída eletroforética durante 15 minutos a 150 volts, a fim de que as proteínas fossem liberadas das tiras de papel Whatman 3 MM para o gel. Desligou-se o aparelho, retirou-se o gel das cubas e, em seguida, removeram-se as tiras com auxílio de pinça cirúrgica. Após este procedimento, conectou-se novamente o gel às cubas e ligou-se o aparelho a 200 volts, segundo metodologia utilizada por Arimura (1997). Após a corrida eletroforética, o gel foi cortado horizontalmente em quatro fatias, com auxílio de guias e mediante o uso de um fio de nylon. As fatias dos géis foram, então, colocadas sobre bandejas refratárias tipo Pyrex e sobre elas foram vertidas as soluções com os substratos específicos para cada sistema enzimático, conforme Borsoi Filho (1995).

Para o sistema peroxidase (POD), as bandejas refratárias foram colocadas em câmara fria a 4 °C, até o aparecimento das bandas isoenzimáticas. Já para os sistemas isoenzimáticos esterase (EST), fosfatase alcalina (ACP) e malato desidrogenase (MDH), as bandejas refratárias foram colocadas em estufa à temperatura de 37 °C, no escuro, até o aparecimento das bandas isoenzimáticas. Em seguida, as soluções reveladoras foram descartadas pela passagem de água corrente e os padrões nos géis foram fixados, durante 12 horas em câmara fria a 4 °C, com uma solução com 10% de glicerina. Após este período, a solução de glicerina foi removida e substituída por uma solução com 65% (v/v) de álcool etílico, 30% (v/v) de água e 5% (v/v) de glicerina, durante 5 minutos, com o objetivo de se desidratarem os géis. Imediatamente após, os géis foram secados pelo método do bastidor e armazenados em papel-toalha. A avaliação das bandas foi feita de acordo com a sua intensidade.

2.4 Mensuração da concentração de etileno

A mensuração da concentração de etileno foi realizada apenas para a variedade 'Dover'.

Para a determinação da concentração de etileno produzido no interior dos frascos de cultivo, ao longo do desenvolvimento dos brotos, tufo foram subdivididos, sob condições assépticas e as plantas individualizadas, transferidas para frascos de vidro (240 mL de capacidade) contendo 30 mL de meio MS, com 30 g L⁻¹ de sacarose e 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, solidificado com 2,5 g L⁻¹ de Phytigel® (Sigma Chemical Company, USA) e acrescido de 2,0 mg L⁻¹ de BAP (meio indutor de hiperidricidade) ou sem adição de BAP (meio não indutor de hiperidricidade - controle), sendo o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120 °C, 1,1 Pa por 20 minutos.

Os frascos foram tampados com 2 camadas de filme plástico transparente de PVC (Goodyear, Brasil), no qual foram fixados septos de silicone para retirada das amostras da atmosfera interna, e as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento sob temperatura de 26 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹.

Após 5, 10, 20 e 35 dias de cultivo, os frascos foram abertos em câmara de fluxo laminar, por 30 minutos, para permitir as trocas gasosas com o meio externo e, então, vedados novamente e levados à sala de crescimento. Ao final de 24 horas, com auxílio de uma seringa de 1 cm³ com agulha tipo 29G de ½ polegada (B-D, Becten Dickinson Co., EUA), 1 mL do ambiente interno dos frascos foi retirado e utilizado como fonte de amostras para determinação da concentração de etileno produzido em 24 horas, para o período de mensuração.

A unidade experimental foi composta por 1 frasco com 4 ramos. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados no tempo, sendo as repetições escolhidas por meio de sorteio, com 5 repetições por tratamento, num arranjo fatorial 2 x 4 (2 meios de cultivo – indutor e não indutor de hiperidricidade x 6 períodos de avaliação).

A mensuração dos níveis de etileno foi realizada no Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, da UFV. Utilizou-se cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5890, séries II, equipado com coluna de aço inoxidável empacotada com Poropak-Q (80 – 100 mesh), de 3,2 mm de diâmetro interno e 1,5 m de comprimento, tendo como fase móvel o nitrogênio, com fluxo de 30 mL s⁻¹. As temperaturas da coluna, do injetor e do detector eram mantidas em 60, 75 e 135 °C, respectivamente. O etileno produzido foi expresso em pmol h⁻¹ g⁻¹ de matéria fresca.

2.5 Análise de Clorofila

A análise dos teores de clorofila foi realizada aos 35 dias de cultivo, utilizando plantas normais e hiperídricas dos morangueiros ‘Dover’ e ‘Burkley’. Amostras de 100 mg de folhas foram maceradas em almofariz com acetona 80% (v/v) e areia lavada e filtradas em papel-filtro. Após a primeira filtração, o papel de filtração foi lavado com acetona 80 % (v/v), para retirar o resíduo de material. Em seguida o volume do balão foi completado para 25 mL, determinando-se a absorbância em 645 e 663 nm (Hendry e Price, 1993).

3 RESULTADOS

3.1 Características morfológicas da hiperidricidade.

Os primeiros sintomas de hiperidricidade foram observados 8 e 10 dias após o subcultivo, nas variedades 'Burkley' e 'Dover', respectivamente, com o surgimento de folhas translúcidas e frágeis, com reduzido alongamento dos brotos, quando comparado a plantas normais (Figura 1). Já nas primeiras brotações, podia-se observar o desenvolvimento anormal das plantas, uma vez que essas mostravam um padrão de crescimento em forma de roseta, ou seja, os novos brotos possuíam entrenós engrossados e pouco alongados (Figura 1C). Dessa forma, esses brotos ficavam na base da planta, grande parte imersa no meio de cultivo (Figura 1B).

A evolução da hiperidricidade foi acompanhada ao longo do desenvolvimento das plantas de morangueiro, em diferentes concentrações de BAP, empregando-se Ágar ou Phytigel[®] como agente gelificante (Figura 2).



Figura 1. Aspecto das brotações de morangueiro (*Fragaria x ananassa*). (A) Comparação de uma planta não hiperídrica, em meio MS na ausência de reguladores (1) e hiperídrica, em meio MS suplementado de 3,0 mg L⁻¹ de BAP (2), aos 35 dias de cultivo. (B) Detalhe do crescimento de uma planta hiperídrica de morangueiro 'Burkley' em meio MS suplementado de 0,5 mg L⁻¹ BAP. (C) Brotações do morangueiro 'Dover', em meio suplementado de 3,0 mg L⁻¹ de BAP, com sintomas característicos de hiperidricidade, como folhas vítreas e mal-formadas.

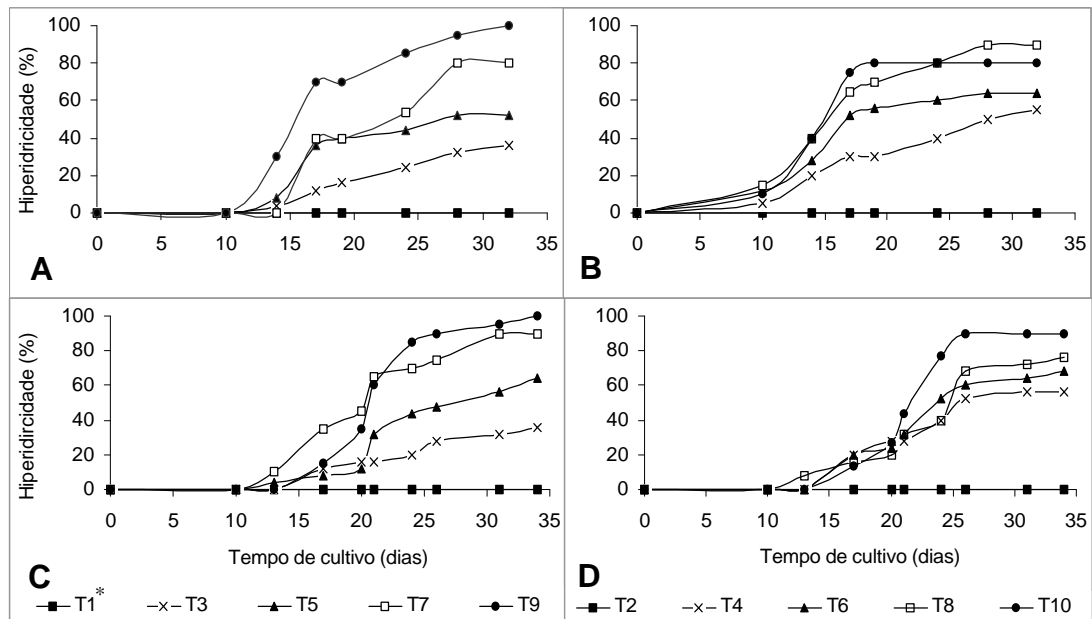


Figura 2. Frequências de hiperidricidade ao longo do desenvolvimento de morangueiro ‘Burkley’ (A e B) e ‘Dover’ (C e D), sob diferentes concentrações de BAP (mg L^{-1}) em meio MS solidificado com Ágar (A e C) ou Phytigel[®] (B e D).

*T1, T3, T5, T7 e T9: 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L^{-1} de BAP, respectivamente, semi-sólido com ágar. T2, T4, T6, T8 e T10: 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L^{-1} de BAP, respectivamente, semi-sólido com Phytigel[®].

A percentagem final de hiperidricidade nas diferentes concentrações de BAP, em meio solidificado com Ágar ou Phytigel[®], calculada ao final do experimento, é apresentada nas Tabelas 1 e 2.

Neste estudo, para as duas variedades, os tratamentos que não envolveram a adição de BAP ao meio originaram plantas sem características de hiperidricidade (Figura 2 e Tabelas 1 e 2), com entrenós longos, folhas expandidas (Figura 1 A1) e diferenciação de raízes nos primeiros 10 dias de cultivo em 100% das culturas (dados não mostrados). No entanto, a taxa de proliferação de brotos (Figura 3) ficou muito reduzida, quando comparada àquelas obtidas nos tratamentos onde foi adicionado BAP. Para os demais tratamentos, a percentagem de hiperidricidade aumentou à medida que se aumentou a concentração de BAP no meio.

Tabela 1. Percentagem de hiperidricidade aos 35 dias de cultivo em morangueiro 'Burkley' em meio MS com diferentes concentrações de BAP, solidificado com Ágar ou Phytigel®

BAP (mg L ⁻¹)	Hiperidricidade (%)	
	Ágar	Phytigel
0,0	0 e A	0 c A
0,5	36 d A	55 b A
1,0	52 c A	64 b A
2,0	80 b A	90 a A
3,0	100 a A	80 a A

± desvio padrão da média

Médias acompanhadas de mesma letra maiúscula em uma mesma linha e minúscula em uma mesma coluna não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Percentagem de hiperidricidade em morangueiro 'Dover' em meio MS com diferentes concentrações de BAP, solidificado com Ágar ou Phytigel® aos 35 dias de cultivo

BAP (mg L ⁻¹)	Hiperidricidade (%)	
	Ágar	Phytigel
0,0	0 d A	0 c A
0,5	35 c A	60 b A
1,0	56 b A	60 b A
2,0	90 a A	76 b A
3,0	100 a A	100 a A

± desvio padrão da média

Médias acompanhadas de mesma letra maiúscula em uma mesma linha e minúscula em uma mesma coluna não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Quando o Phytigel® foi utilizado em substituição ao Ágar, uma maior percentagem de hiperidricidade foi observada, embora não significativo a 5% de probabilidade, nos tratamentos com 0,5 a 2,0 mg L⁻¹ de BAP, em 'Burkley', e nos tratamentos com 0,5 a 1,5 mg L⁻¹ de BAP, na variedade 'Dover'. No tratamento com 3,0 mg L⁻¹ de BAP, a substituição de Ágar por Phytigel® aumentou a ocorrência de brotos hiperídricos no início do

desenvolvimento (Figura 2), porém este aumento não se manteve constante ao longo do período de incubação (Tabelas 1 e 2).

As taxas de proliferação dos brotos ao longo do desenvolvimento *in vitro* das variedades 'Dover' e 'Burkley' podem ser verificadas na Figura 3. Os tratamentos sem adição de BAP no meio exibiram proliferação de brotos significativamente menor que os demais tratamentos. Todavia, estas variedades apresentaram comportamentos diferentes quanto à formação de novos brotos, quando os meios de cultivo foram suplementados com BAP. Em 'Burkley', a formação de novos brotos foi maior nos tratamentos com 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP, utilizando Ágar como agente gelificante, não diferindo significativamente dos tratamentos com 0,5 mg L⁻¹ de BAP utilizando Agar ou com 2,0 e 3,0 mg L⁻¹ de BAP com Phytigel® (Figura 3). Para 'Dover', os meios de cultivo suplementados com BAP não diferiram significativamente entre si (Figura 3).

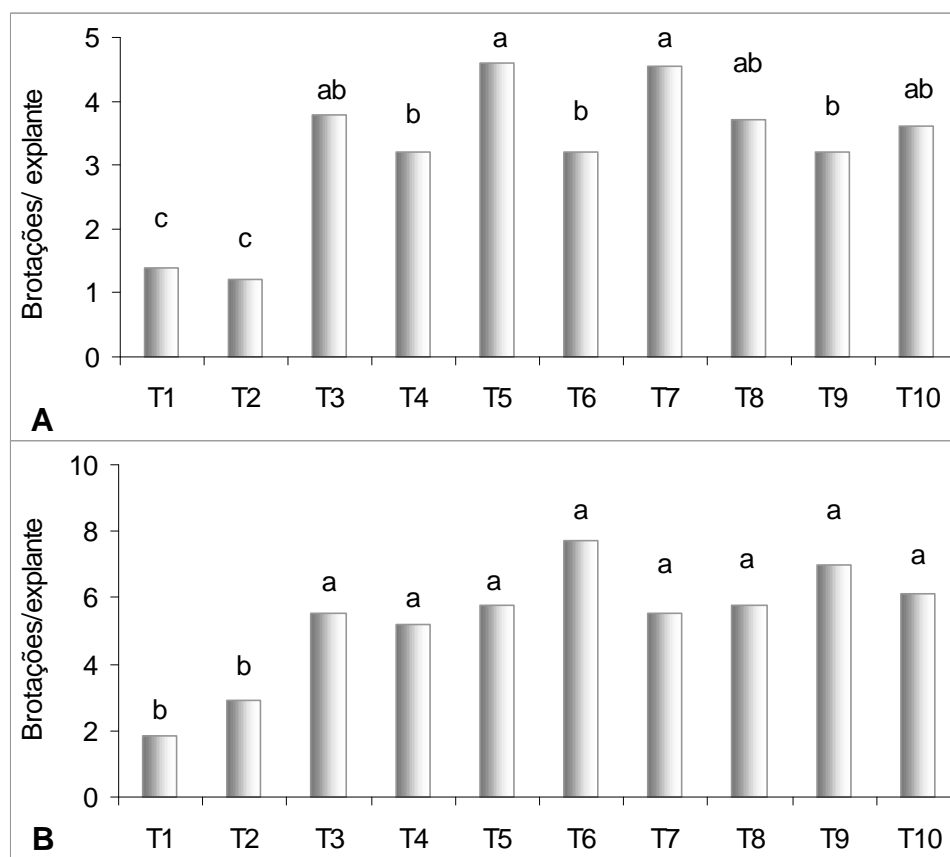


Figura 3. Número de brotações por explante do morangueiro ‘Burkley’ (A) e ‘Dover’ (B) em diferentes concentrações de BAP (mg L^{-1}), com Ágar ou Phytigel[®]. Média \pm desvio padrão. Barras com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*T1, T3, T5, T7 e T9: 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L^{-1} de BAP, respectivamente, semi-sólido com ágar. T2, T4, T6, T8 e T10: 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L^{-1} de BAP, respectivamente, semi-sólido com Phytigel[®].

3.2 Análises anatômicas e ultra-estruturais

As plantas normais caracterizaram-se por apresentarem estrutura dorsiventral bem definida (Figura 4A, C, E e G), estando, o parênquima paliçádico, formado por uma única camada de células que ocupam, aproximadamente, metade da espessura do mesofilo; o lacunoso, por sua vez com duas ou três camadas largas de células com abundância de

espaços intercelulares. À medida que a concentração de BAP foi aumentando, aumentou a dificuldade de se delimitar os parênquimas paliçádico e lacunoso, com tendência a formar células arredondadas e hipertrofiadas, com incremento nas larguras das lâminas e redução na expansão das mesmas (Figura 4 B, D, F, H, I e J). As células localizadas abaixo do feixe vascular de menor porte ficaram hipertrofiadas, especialmente as células epidérmicas, dando aspecto ondulado ao tecido de revestimento das plantas hiperídricas (Figura 4J).

As superfícies abaxial e adaxial das folhas normais e hiperídricas, das duas variedades, foram analisadas pela microscopia eletrônica de varredura, revelando células epidérmicas com aspecto plasmolisado (Figura 5B) e menor deposição de cera epicuticular nas plantas hiperídricas, quando comparadas ao controle não hiperídrico (Figura 5). Também foram observadas diferenças estruturais entre as duas variedades, quanto à deposição de cera epicuticular, apresentando a variedade 'Burkley' maior quantidade dessa substância (Figura 5A e C). A folha de morangueiro é anfiestomática, com maior ocorrência de estômatos na face abaxial. Observou-se a ocorrência de estômatos mal-formados nas amostras provenientes de meios de cultura indutores de hiperidricidade, apresentando padrão de células-guarda hipertrofiadas e deformadas, ao contrário daquelas de conformação elíptica típica, em folhas não hiperídricas (Figura 5 A, C, E e G). Assim, as células-guarda hiperídricas eram maiores do que as não hiperídricas, com a parede celular que delimita o poro estomático protraída e, muitas vezes, rompida, resultando na deformação da célula-guarda (Figura 5B, D, F e H), levando à ocorrência de irregularidades na epiderme inferior (Figura 4 B, D, F, H, I e J).

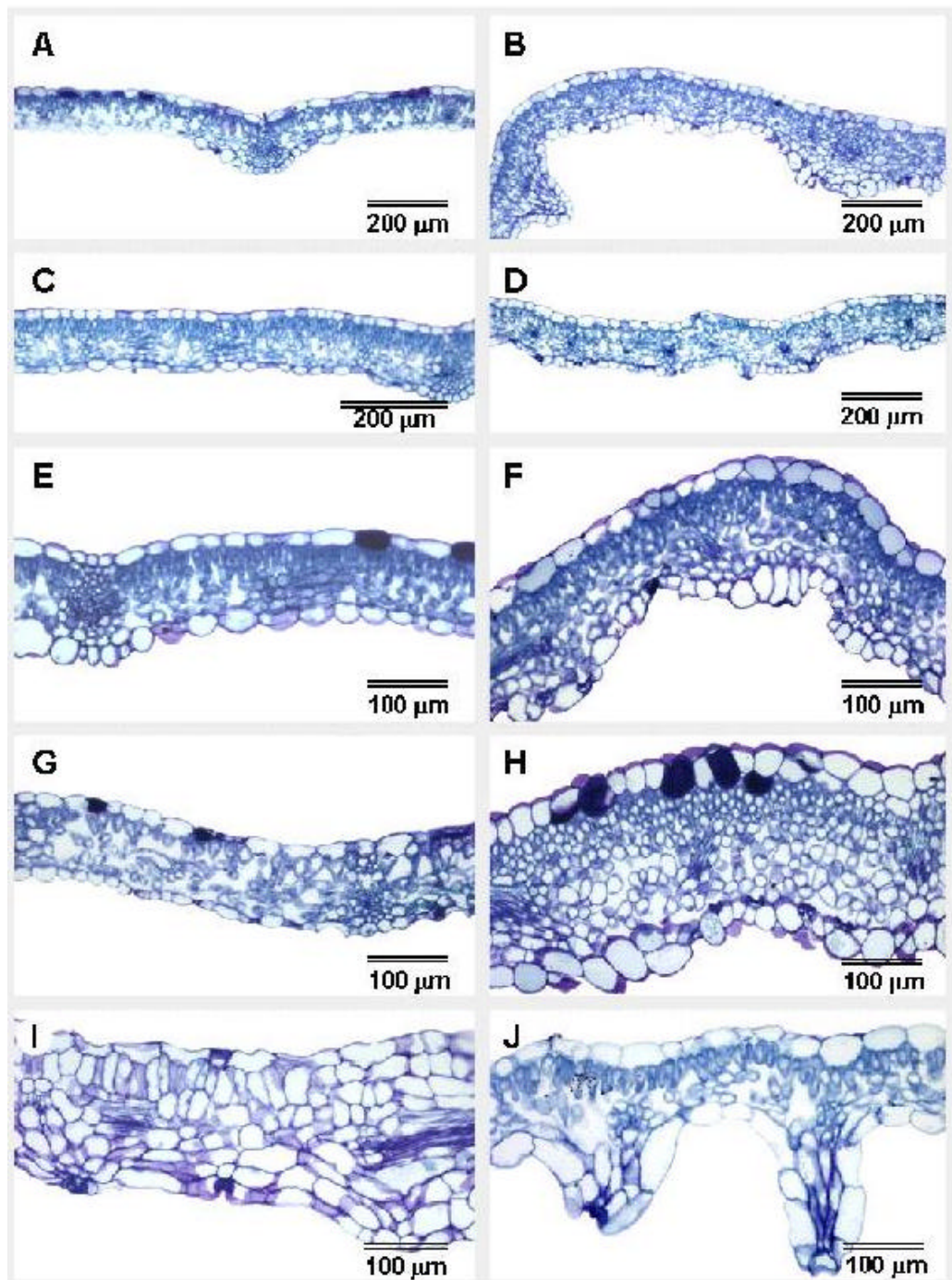
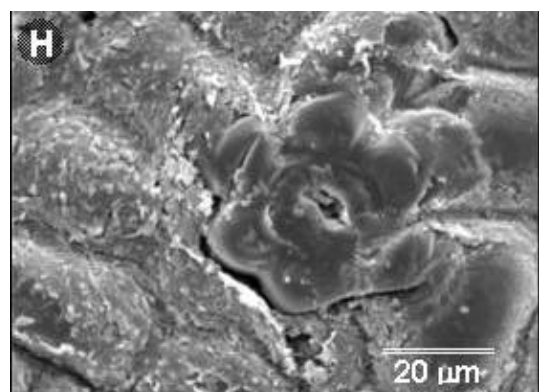
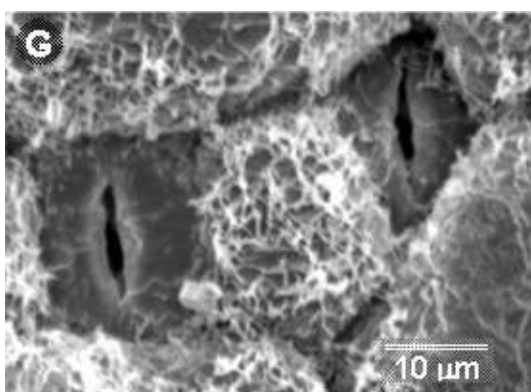
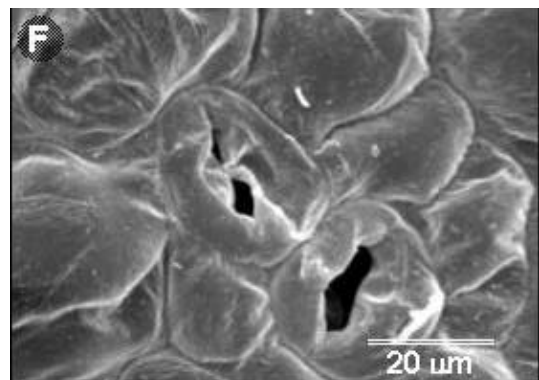
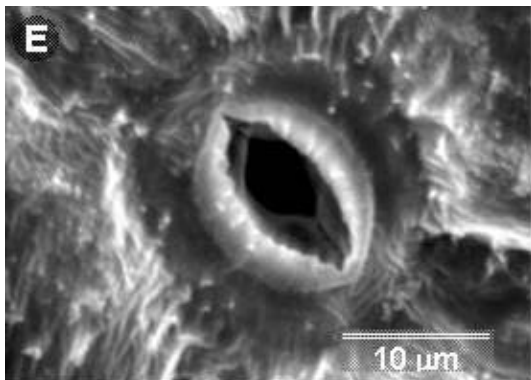
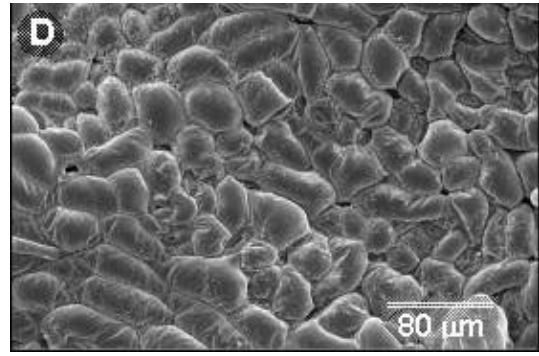
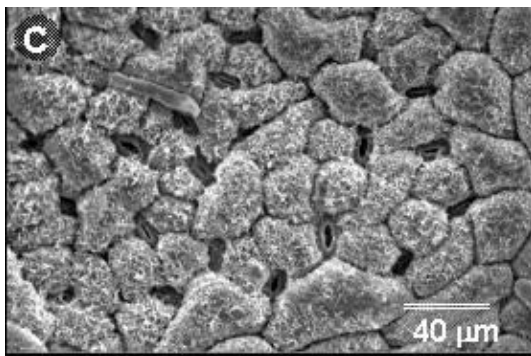
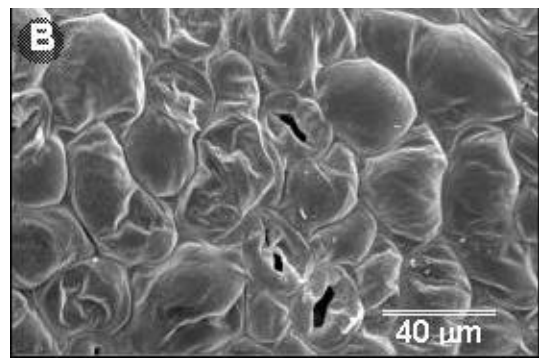
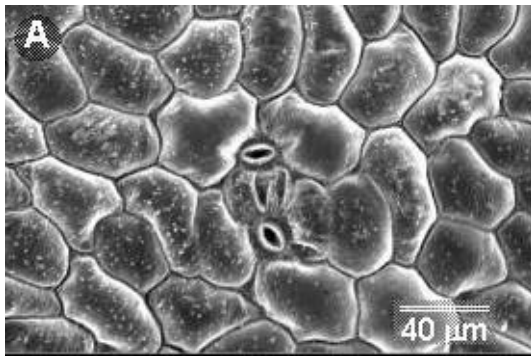


Figura 4. Seções transversais das folhas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) normais (A, C, E e G) propagado *in vitro* em meio ausência de reguladores de crescimento e hiperídricos (B, D, F, H, I e J) propagados *in vitro* em meio de cultivo indutor de hiperidricidade, e coradas com Azul de Toluidina. Notar a evidente perda da característica dorsiventral das folhas (B, D, F, H e I), a ocorrência de células hipertrofiadas e a deformação da epiderme.

Figura 5. Eletromicrografias de varredura da superfície foliar abaxial de morangueiros (*Fragaria x annanassa* Duch.) normais (A, C, E e G) propagado *in vitro* em meio com ausência de reguladores de crescimento e hiperídricos (B, D, F e H) propagados *in vitro* em meio de cultivo com 3 mg L⁻¹ BAP. (A) folha de morangueiro 'Dover' evidenciando estômatos normais; (B) folha de morangueiro 'Dover', evidenciando estômatos mal-formados; (C) folha de morangueiro 'Burkley', evidenciando marcante deposição de cera epicuticular e estômatos normais; (D) Superfície adaxial de folha de morangueiro 'Burkley' propagado *in vitro* em meio de cultivo com 3 mg L⁻¹ BAP, evidenciando estômatos deformados e redução da deposição de cera epicuticular; (E) Detalhe de estômato de 'Dover' diferenciado na face adaxial foliar mostrando-se estômato normal (F) Detalhe de estômato de 'Dover' diferenciado na face adaxial foliar mostrando estômato mal-formado; (G) Detalhe de estômatos normais de 'Burkley', evidenciando a presença de deposição de cera epicuticular; (H). Detalhe de estômato hiperídrico de 'Burkley'. Notar a marcante redução na deposição de cera epicuticular.



3.3 Análises bioquímicas

Houve incremento nas atividades das enzimas antioxidativas peroxidase e catalase proporcionalmente ao aumento da concentração de BAP no meio de cultivo (Tabelas 3 e 4). Na variedade 'Burkley', a atividade de peroxidases aumentou com o aumento da concentração de BAP, tanto nos meios contendo Ágar quanto ao se utilizar Phytigel[®] como agente gelificante, não sendo detectada diferença significativa entre esses agentes gelificantes, independente da presença ou não de BAP (Tabelas 3 e 4). Em 'Dover', esse comportamento foi semelhante, exceto para os tratamentos utilizando Ágar, onde a atividade dessa enzima foi aumentada somente até 1,0 mg L⁻¹ de BAP.

A atividade das catalases (CATs), nas duas variedades, também foi aumentada com a suplementação de BAP ao meio. Em meios gelificados com Phytigel[®] houve maior atividade dessa enzima em 'Dover' (Tabela 4), quando se utilizou 2,0 mg L⁻¹ de BAP, e em 'Burkley' (Tabela 3), ao se adicionar 0,5 ou 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Ao se utilizar Ágar como agente gelificante, maiores atividades de catalase foram observadas com 2,0 mg L⁻¹ e com 3,0 mg L⁻¹ de BAP, em 'Burkley' e 'Dover', respectivamente.

A atividade de SOD foi diminuída significativamente com o aumento da concentração de BAP ao meio de cultivo em 'Burkley'. Em 'Dover', a atividade dessa enzima aumentou com 2,0 e com 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de BAP, em meio gelificado com Ágar e com Phytigel, respectivamente.

Tabela 3. Efeito do BAP e dos agentes gelificantes sobre a atividade enzimática em tecidos da parte aérea do morangueiro 'Burkley' *in vitro*

BAP (mg L ⁻¹)	Atividade enzimática ¹					
	POD ²		CAT		SOD	
	Ágar	Phytigel	Ágar	Phytigel	Ágar	Phytigel
0,0	2,15 b A	2,63 b A	0,09 c A	0,07 c A	1948,15 a A	1486,81 a A
0,5	20,23 ab A	21,39 ab A	0,46 c B	4,07 a A	261,66 c B	320,43 b A
1,0	24,36 ab A	26,72 ab A	2,21 b A	3,39 a B	537,08 b A	287,08 b B
2,0	34,72 a A	34,44 a A	3,31 a A	2,37 b B	151,90 c A	93,80 c B
3,0	43,8 a A	45,63 a A	2,46 ab A	2,46 b A	157,86 c B	372,93 b A

¹ Médias acompanhadas de mesma letra maiúscula em uma mesma linha e minúscula em uma mesma coluna não diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

² PODs - Peroxidases (mmoles min⁻¹ mg⁻¹ MF)

CATs - Catalases (mmoles min⁻¹ mg⁻¹ MF)

SODs - Dismutases do superóxido (unidades de SOD min⁻¹ g⁻¹ MF)

Tabela 4. Efeito do BAP e dos agentes gelificantes sobre a atividade enzimática em tecidos da parte aérea do morangueiro 'Dover' *in vitro*

BAP (mg L ⁻¹)	Atividade enzimática ¹					
	POD ²		CAT		SOD	
	Ágar	Phytigel	Ágar	Phytigel	Ágar	Phytigel
0,0	3,50 d A	3,64 e A	0,06 c A	0,11 c A	585,99 b A	587,51 b A
0,5	32,14 c A	42,90 d A	0,19 c A	0,51 c B	599,84 b B	816,49 a A
1,0	106,97 a A	56,28 c B	0,30 bc A	0,31 c A	383,28 c B	879,07 a A
2,0	93,71 b A	78,81 b A	0,91 b A	1,86 b A	1204,83 a A	364,46 c B
3,0	101,64 ab A	108,49 a B	3,78 a A	3,69 a A	643,29 b A	489,84 bc B

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada enzima e para cada concentração de BAP, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

² PODs - Peroxidases (mmoles min⁻¹ mg⁻¹ MF)

CATs - Catalases (mmoles min⁻¹ mg⁻¹ MF)

SODs - Dismutases do superóxido (unidades de SOD min⁻¹ g⁻¹ MF)

A peroxidação de lipídios, influenciada pela presença de BAP e de agentes gelificantes adicionados ao meio de cultivo nas variedades estudadas pode ser observada na Tabela 5. O BAP aumentou significativamente a formação do complexo MDA-TBA e, conseqüentemente,

a peroxidação dos lipídios nas duas variedades estudadas. Na ausência de BAP, não houve diferenças significativas entre os agentes gelificantes utilizados.

A concentração do complexo MDA-TBA, na variedade 'Burkley', foi maior no tratamento com 0,5 mg L⁻¹ de BAP, independente do agente gelificante (Tabela 5). Quando se utilizou Ágar, os demais tratamentos não diferiram significativamente, embora, na ausência de BAP, seja possível observar uma redução da concentração desse complexo. Já ao se utilizar Phytigel[®], a ausência de BAP proporcionou uma redução na formação do complexo MDA-TBA significativa, em relação aos tratamentos contendo BAP, os quais não diferiram entre si. Embora o tratamento com 0,5 mg L⁻¹ de BAP tenha mostrado níveis mais elevados de formação do complexo MDA-TBA, este não diferiu significativamente dos demais tratamentos com BAP.

Em 'Dover' (Tabela 5), a concentração do complexo MDA-TBA foi maior na presença de 0,5 L⁻¹ de BAP, com Phytigel[®] como agente gelificante, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Porém, ao se utilizar Ágar, esse incremento só foi significativo na presença de 2,0 mg L⁻¹ de BAP, quando comparado aos demais tratamentos, utilizando ou não BAP.

Tabela 5. Efeito do BAP e de agentes gelificantes sobre a peroxidação dos lipídios em tecidos da parte aérea de duas variedades de morangueiro cultivado *in vitro*

BAP (mg L ⁻¹)	Peroxidação dos lipídios (nmoles de MDA-TBA g ⁻¹ MF)			
	'Burkley'		'Dover'	
	Ágar	Phytigel	Ágar	Phytigel
0,0	3,94 b A	4,43 b A	6,41 c A	7,85 c A
0,5	44,81 a A	27,18 a A	12,82 b B	37,66 a A
1,0	18,21 b A	26,70 a A	15,16 b A	12,16 c A
2,0	17,40 b A	18,69 a A	36,70 a A	15,87 bc B
3,0	17,63 b B	23,33 a A	11,11 b A	24,04 b A

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada variedade e para cada concentração de BAP, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Isoenzimas

Nos zimogramas, as bandas foram avaliadas conforme a intensidade de coloração. Em morangueiro, os géis relativos aos sistemas isoenzimáticos malato desidrogenase (MDH), peroxidase (POD), fosfatase ácida (ACP) e esterase (EST) estão mostrados na Figura 6. A migração das bandas ocorreu no sentido do pólo positivo, exceto POD que migrou também ao pólo negativo. Apesar de se tratar de propagação clonal, à exceção do sistema de fosfatase ácida, os demais sistemas apresentaram variação de presença ou mesmo de intensidade das bandas obtidas.

Em 'Dover', o sistema POD apresentou variação no número e intensidade das bandas formadas, de modo especial naquelas que migraram ao pólo negativo (Figura 6H). Dessas bandas, as respectivas aos tratamentos provenientes de meios de cultivo suplementados com BAP, houve maior intensidade, comparativamente às amostras do tratamento controle (sem suplementação de BAP). Todavia, em 'Burkley', o mesmo sistema não apresentou variação no número das bandas formadas e nem na intensidade daquelas monomórficas resultantes da migração em direção ao pólo negativo (Figura 6 G). Para 'Dover' e 'Burkley' a ACP apresentou maior intensidade para algumas bandas pertencentes aos controles (C) (Figura 6 A e B). Quanto à MDH, essa se mostrou mais ativa em 'Burkley' do que em 'Dover', sendo que em 'Burkley' houve bandas que se formaram apenas no material cultivado em presença de BAP (Figuras 6 E e F).

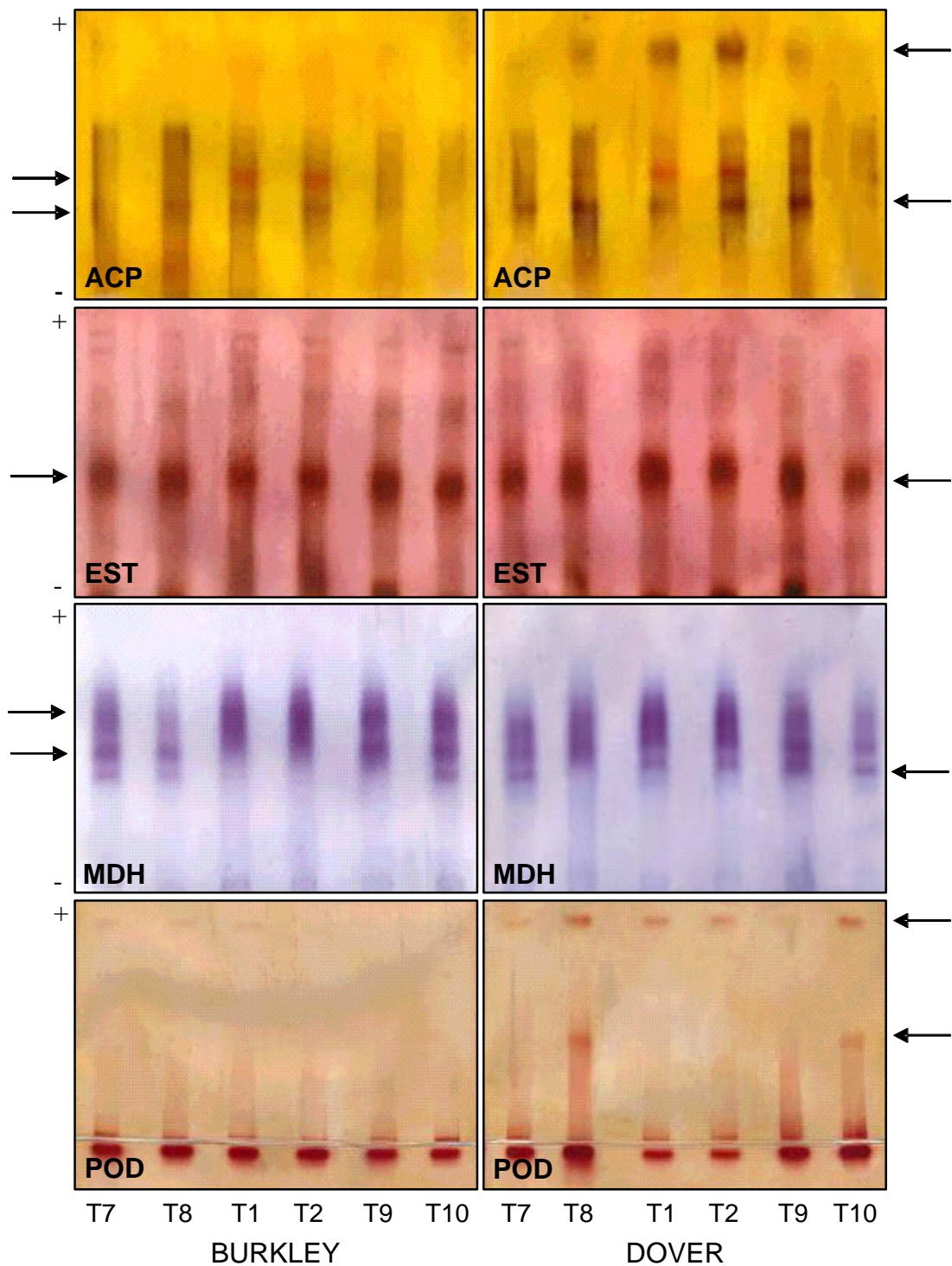


Figura 6. Análise isoenzimática pelo sistema fosfatase alcalina (ACP), esterase (EST), malato desidrogenase (MDH) e peroxidase (POD) de folhas de morangueiro 'Burkley' e 'Dover' em diferentes concentrações de BAP em meio semi-sólido com Ágar ou Phytigel®.

*T1, T7 e T9: 0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente, semi-sólido com ágar. T2, T8 e T10: 0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente, semi-sólido com Phytigel®. Nas setas, as principais diferenças entre os tratamentos.

3.4 Mensuração do etileno

Aos 10 dias de cultivo, as brotações de morangueiro no meio contendo 2 mg L^{-1} de BAP já apresentavam sinais de hiperidricidade, sendo que aos 25 dias, 100% dessas brotações estavam hiperídricas.

A produção de etileno no interior dos frascos de cultivo nas plantas hiperídricas e não hiperídricas do morangueiro 'Dover' pode ser observado na Figura 7. Nas plantas cultivadas em meio indutor de hiperidricidade (MS + BAP), o maior nível de produção de etileno ocorreu aos cinco dias de cultivo, quando esta produção foi em torno de 290% em relação aos frascos contendo meio não indutor de hiperidricidade (MS), para os quais a maior produção ocorreu somente no vigésimo dia de cultivo. Após este período, iniciou-se o decréscimo dos níveis de etileno em ambos os meios (Figura 7).

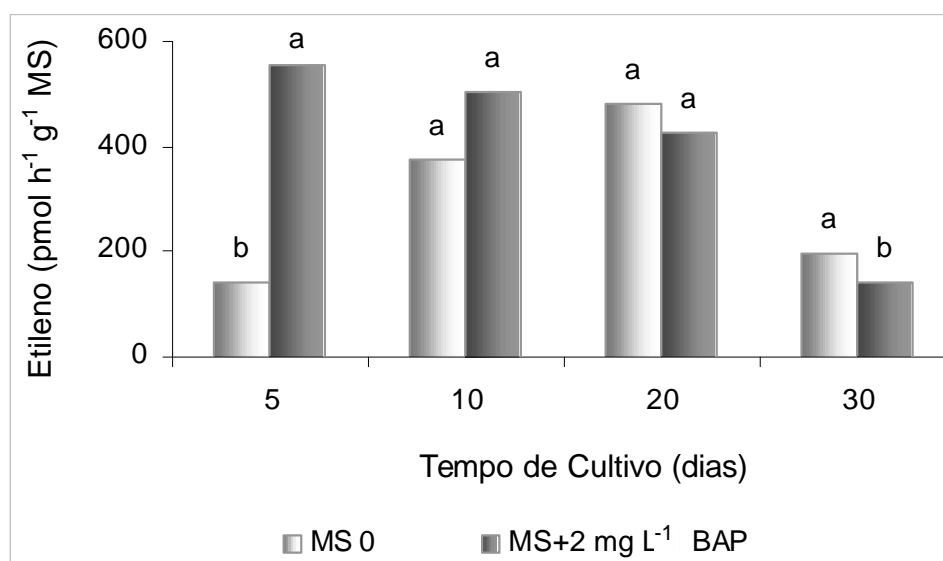


Figura 7. Produção de etileno nos frascos de cultivo com meio indutor (MS + BAP) e não indutor (MS0) de hiperidricidade ao longo do desenvolvimento *in vitro* do morangueiro 'Dover'.

Médias com letras iguais, para cada dia de avaliação, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.5 Teor de clorofila

Quando comparadas as plantas normais e hiperídricas, foi observada diferença no conteúdo de clorofila (Figura 8). As duas variedades estudadas tiveram comportamento semelhante, sendo que os níveis de clorofila *a* nas hiperídricas ficaram em torno de 50% dos níveis encontrados em plantas sem características de hiperidricidade. O mesmo padrão foi verificado para clorofila *b* e totais que em plantas hiperídricas variaram em torno de 60% e 51%, respectivamente, do conteúdo em plantas não hiperídricas (Figura 8).

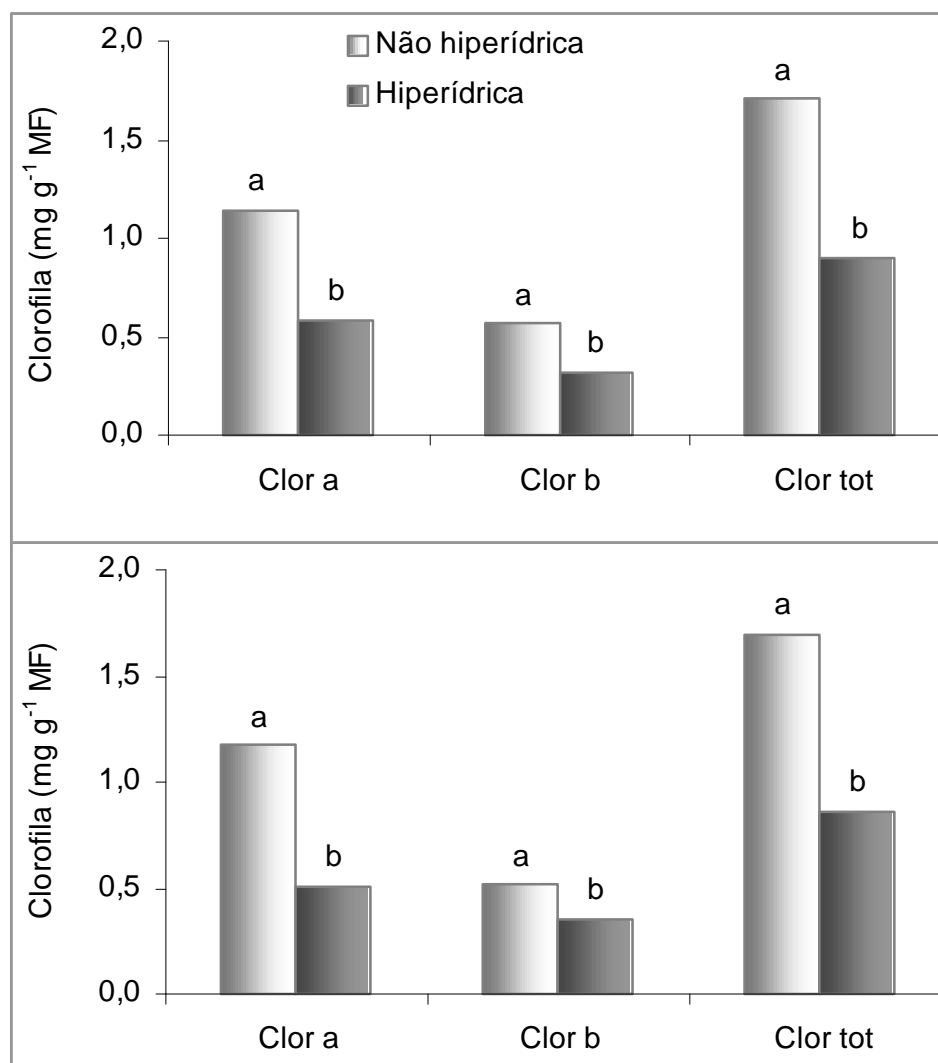


Figura 8. Conteúdo de clorofila em plantas hiperídricas e não hiperídricas de *Fragaria ananassa* cv. 'Dover' (A) e 'Burkley' (B) após 35 dias de cultivo. Barras com letras diferentes, para cada categoria de clorofila, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

4 DISCUSSÃO

As análises estruturais revelaram que os estômatos das folhas normais eram estruturalmente típicos. No entanto, os estômatos das folhas hiperídricas apresentaram células-guarda maiores que as de plantas normais, devido à grande absorção de água, que leva à turgidez e a mudanças na estrutura celular. Também foram observadas em estômatos

hiperídricos, células-guarda irregulares, sendo mais arredondadas que alongadas devido, provavelmente, à diminuição da elasticidade ou a modificações no padrão de deposição de microfibrilas de celulose típico de células-guarda, o que resulta em dificuldade de fechamento do estômato. Resultados semelhantes foram encontrados em plantas hiperídricas de tabaco (Miguens et al., 1993), pimentão (Fontes, et al., 1999), cravo (Werker e Leshem, 1987; Ziv e Ariel, 1992; Ziv e Ariel, 1994; Olmos e Hellin, 1998), eucalipto (Louro et al., 1999), jojoba (Apóstolo e Llorente, 2000), berinjela (Picoli et al., 2001), lisianthus (Paek e Hahn, 2000), macieira (Chakrabarty et al., 2005), onde foram observadas anormalidades na forma e no tamanho das células-guarda.

Tais deformações podem ser resultantes de mudanças estruturais nas células-guarda, seguidas por mudanças na composição da parede celular. Baixos níveis de celulose, pectina e cutina e elevados níveis de calose foram observados em plantas hiperídricas de cravo (Werker e Leshem, 1987; Ziv e Ariel, 1992) e de *Prunus cerasus* (Marin et al., 1988). Alterações desta natureza são, também, acompanhadas pela deformação das paredes celulares, pela perda de elasticidade ou por modificações no padrão de deposição de microfibrilas de celulose (Ziv e Ariel, 1992). O decréscimo na síntese de lignina e de celulose é uma consequência da menor concentração de enzimas e substâncias fenólicas, causada pela entrada de água em abundância nas células, em função da reduzida pressão da parede celular (Kevers et al., 1984). Estas alterações nos estômatos, associadas à redução ou ausência de cera epicuticular nas plantas *in vitro* são algumas das causas que limitam a sobrevivência de plantas hiperídricas sob condições *ex vitro*.

Segundo Jain et al. (2001), a ausência de reguladores de crescimento no meio de cultivo proporciona o desenvolvimento de maiores frequências de plantas normais, enquanto o meio suplementado com BAP, leva ao desenvolvimento de hiperidricidade. Neste estudo, para as duas variedades avaliadas, os tratamentos sem adição de BAP originaram plantas sem características de hiperidricidade. No entanto, a taxa de proliferação de brotos ficou muito reduzida, quando comparada àquelas obtidas nos tratamentos onde foi adicionado BAP. A presença de citocininas oi também

associada à ocorrência de hiperidricidade em cultura de ápices caulinares de *Lisianthus* (Paek e Hahn, 2000).

Franck et al. (1997) induziram hiperidricidade em brotos de *Prunus avium* substituindo Ágar por Phytigel®. Para *Fragaria x ananassa*, foi observado comportamento semelhante, uma vez que, quando o Phytigel® foi utilizado em substituição ao Ágar, houve acréscimo na hiperidricidade nos tratamentos com 0,5 a 1,5 mg.L⁻¹ de BAP em 'Dover' e 0,5 a 2,0 mg L⁻¹ de BAP, na variedade 'Burkley'. Este aumento não foi significativo a 5 % de probabilidade. No entanto, parece que o Phytigel® exerceu efeito potencializador do uso do BAP pelas plantas, ou seja, plantas cultivadas em Phytigel® exibiam níveis mais extremos de hiperidricidade, apresentando caules mais suculentos e quebradiços e folhas pouco desenvolvidas.

Os agentes gelificantes utilizados como suportes no cultivo *in vitro* podem influenciar o desenvolvimento de hiperidricidade. Diversos pesquisadores têm optado pelo uso do Phytigel® como agente gelificante, por este conter menos minerais livres que o Ágar. Este agente, além de ser mais puro que o Ágar, tem sido muito utilizado devido à baixa quantidade necessária para proporcionar resultado semelhante ao do Ágar, quanto à solidificação do meio. Porém, de acordo com Franck et al. (1997), sua estrutura física parece permitir maior absorção de substâncias que podem induzir hiperidricidade, como citocininas, íons amônio e água e, com isso, causar ou aumentar a hiperidricidade dos brotos regenerantes,

Nas variedades utilizadas no presente estudo, as taxas de formação de novos brotos axilares foram significativamente aumentadas com a adição de BAP ao meio. A concentração habitual de BAP utilizada em nosso laboratório para promover multiplicação nesta espécie é 1,0 mg L⁻¹ (T5). No entanto, quando foi utilizada a concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP no meio de cultivo com Ágar (T3), esta não apresentou diferenças significativas quanto à formação de novos brotos e, ainda, levou ao atraso no início do desenvolvimento de hiperidricidade e à diminuição da percentagem desse fenômeno, nas duas variedades estudadas.

Ao longo do desenvolvimento dos brotos, foi observada uma diminuição na coloração verde dos brotos hiperídricos, quando comparados aos não hiperídricos. Os resultados da quantificação de clorofilas mostram

uma drástica redução de clorofila *a* e *b* nestes brotos, o que leva à diminuição da capacidade fotossintética dessas plantas. Resultados semelhantes foram relatados por Olmos et al. (1997) em tecidos hiperídricos de cravo. As peroxidases parecem ter um papel importante nesta diminuição de clorofila. Em folhas de espinafre as clorofilases parecem ter pouca participação na degradação de clorofila e as peroxidases são as principais enzimas envolvidas neste processo (Yamauchi e Watada, 1991).

Como observado por Olmos et al. (1997) e Saher et al. (2004), o excesso de água em tecidos hiperídricos pode levar a níveis de saturação, causando hipoxia. Sob esta condição de estresse, algumas atividades metabólicas geradoras de H₂O₂ em plantas podem ser aumentadas, produzindo níveis tóxicos de H₂O₂ e gerando estresse oxidativo. A existência de injúria oxidativa em tecidos hiperídricos foi confirmada neste estudo, com o aumento na atividade de enzimas antioxidantes e no conteúdo de MDA encontrados em folhas hiperídricas, quando comparados ao controle não hiperídrico.

Verificou-se incremento na atividade de peroxidase proporcional ao aumento da concentração de BAP e da hiperidricidade. Uma clara relação entre hiperidricidade e atividade de enzimas antioxidantes também foi observada em *Prunus avium* (Franck et al., 1998), *Dianthus caryophyllus* (Olmos et al., 1997; Saher et al., 2005) e *Nicotiana tabacum* (Piqueras et al., 1998), onde tecidos hiperídricos apresentavam modificações nos níveis dessas enzimas, quando comparados ao controle não hiperídrico. Para onze espécies testadas, apenas duas (*Fuchsia* e *Prunus rhexii*) apresentaram reduções de atividades de peroxidases, 66 e 42%, respectivamente, quando a condição hiperídrica foi comparada à normal (Kevers et al., 1984). As demais apresentaram atividade superior em plantas hiperídricas, em relação às normais.

Na presença de BAP, o aumento na atividade das PODs sugere que a produção de H₂O₂, de compostos fenólicos e/ou de hidroperóxidos, principais substratos dessas enzimas (Siegel, 1993), tenha sido mais intensa, o que, segundo Peixoto (1998), pode ter contribuído para o aumento da peroxidação dos lipídios nos tecidos dessas variedades.

Como membros de uma família multigênica, em plantas as peroxidases (Classe III; EC 1.11.1.7) estão associadas ao crescimento celular, mecanismos de sinalização nas paredes celulares, lignificação e suberificação, estresses abióticos e bióticos (incluindo patossistemas), simbioses (micorrização e nodulação), senescência e crescimento e maturação de frutos (Passardi et al., 2005). A maior intensidade de bandas do sistema enzimático peroxidase em plantas hiperídricas comprova dano oxidativo, provocado pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio.

A enzima malato desidrogenase catalisa a reação do malato a oxaloacetato, tendo importante função no ciclo de Krebs. Participa também do transporte de malato através da membrana mitocondrial e da fixação de CO₂ nas plantas (Taiz e Zeiger, 2004). Esta enzima tem grande importância na respiração celular. Dessa forma, o aumento da intensidade das bandas dessa enzima, pode estar ligado ao aumento da respiração, que ocorre em plantas em condições de estresse.

A enzima álcool desidrogenase atua no metabolismo anaeróbico de plantas, catalisando a conversão do acetaldeído a etanol (Pertel, 2001). A baixa atividade dessa enzima, verificada em amostras de plantas hiperídricas, pode ter resultado no acúmulo de acetaldeído, que participa de processos de deterioração nas plantas.

Assim como o sistema álcool desidrogenase, o sistema esterase mostrou baixa atividade em plantas hiperídricas. Este sistema enzimático está envolvido em reações de hidrólise de ésteres e desempenha função-chave no metabolismo de lipídeos. (Pertel, 2001).

A indução de SOD nos tecidos hiperídricos sugere um mecanismo de defesa contra a elevada produção de radicais O₂⁻ em folhas hiperídricas. Os resultados apresentados neste trabalho, assim como em cravo (Saher et al., 2005), indicam uma importante ativação do ciclo subcelular de Halliwell Asada em folhas hiperídricas da variedade 'Dover', apesar de, provavelmente, não ter sido efetivo o bastante para prevenir danos em nível celular, que foram confirmados pela elevação da peroxidação de lipídios.

O aumento do nível de peroxidação de lipídios em morangueiro hiperídrico sugere que o acúmulo de H₂O₂ pode gerar a reação de Haber-

Weiss ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^- + \cdot\text{OH} + \text{O}_2$), onde íons metálicos como o Fe podem influenciar a peroxidação de lipídios, pelo aumento da produção de radicais livres hidroxila (OH) (Peixoto, 1998). Dessa forma, moderadas mudanças no conteúdo de Fe na folha podem levar ao estresse oxidativo, quando os radicais superóxido e H_2O_2 são convertidos ao radical hidroxila, que é extremamente reativo.

De acordo com Saher et al. (2004), a peroxidação de lipídios pode ter duas origens: enzimática, devido à atividade lipoxigenase ou autocatalítica, devido a espécies ativas de oxigênio. Dessa forma, o estresse resultando na elevação dos níveis de oxigênio ativo causa mudanças no balanço redox, através da oxidação de compostos metabolicamente ativos, levando a peroxidação e degradação de lipídios.

O acúmulo de etileno *in vitro* e sua relação com o desenvolvimento de hiperidricidade foi previamente relatado por diversos autores (Kevers et al., 1984; Ziv, 1991; Leforestier et al., 1993; Park et al., 2004).

Neste estudo, níveis elevados de produção de etileno foram encontrados em ambiente indutor de hiperidricidade. Resultados semelhantes foram obtidos em tecidos hiperídricos de cravo (Kevers et al., 1984) e de *Fraxinus* sp (Leforestier et al., 1993), onde houve incremento da produção de etileno, quando comparados ao controle. Este aumento da produção de etileno durante o desenvolvimento de plantas hiperídricas pode estar relacionado às alteradas condições ambientais observadas *in vitro*, as quais aceleram a senescência dos tecidos. Após a explosão inicial, a evolução de etileno decresceu nas plantas hiperídricas e no controle, mas permaneceu maior nas hiperídricas. A produção de etileno parece estar relacionada com níveis de peróxidos. Brennan e Frenkel (1977), trabalhando com pêra verificaram que a evolução de etileno aumentou paralelamente à concentração de peróxidos em frutos maduros. Estes autores observaram que o aumento de etileno precedeu ao aumento da concentração de peróxidos, sugerindo que os peróxidos promovem a formação de radicais livres de oxigênio, o que levaria à liberação de etileno a partir de seus metabólitos precursores.

O etileno promove aumento da peroxidação de lipídeos, levando ao aumento da produção de hidroperóxidos que, quando acumulados, podem

levar à reação de Haber Weiss, formando radicais hidroxil que estão entre as espécies mais reativas, capazes de reagir com compostos orgânicos, ativando peroxidases. Estas, por sua vez, afetam a atividade da fenilalanina amônio liase (PAL), os níveis de fenóis e a degradação de clorofilas. O resultado é a hipolignificação e dano na parede celular.

5 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que:

- O aumento da concentração de citocinina leva ao desenvolvimento de hiperidricidade em ambas as variedades;
- Nas concentrações até 2,0 mg L⁻¹ de BAP, a substituição de Ágar por Phytigel[®] induz maior formação de brotos hiperídricos;
- A adição de BAP no meio de cultivo induz ao estresse oxidativo, caracterizado por aumento da atividade de enzimas antioxidantes e da peroxidacao de lipídios, alterações em nível celular, como malformações de estômatos e de células epidérmicas, além de aumento na produção e acúmulo de etileno no interior dos frascos de cultivo;
- O meio de cultivo com 0,5 mg L⁻¹ de BAP e solidificado com Ágar promoveu menor formação de hiperidricidade, não afetando a taxa de multiplicação dos explantes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Arimura, C. T. **Propagação in vitro de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) por meio de segmentos nodais estiolados**. Viçosa: UFV, 1997. 62p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.

Bornman, C. H.; Vogelmann, T. C. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. **Physiologia Plantarum**, 61: 505-512, 1984.

Borsoi Filho, J. L. **Variabilidade isozimática e divergência genética em seis cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Viçosa: UFV, 1995. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.

Bozzola, J. J.; Russel, L. D. **Electron microscopy**. Boston: Jones and Bartlett publishers, 1992. 542p.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, 1976.

Brennan, T.; Frenkel, C. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. **Plant Physiology**, 59: 411-416, 1977.

Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, 52:302-310, 1978.

Calvete, E. O.; Azevedo, M.; Bordignon, M. H.; Suzin, M. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, 20(4):649-653, 2002.

Chakrabarty, D.; Park, S. Y.; Ali, M. B.; Shin, K. S.; Paek, K. Y. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. **Tree Physiology**, 26: 377-388, 2005.

Chance, B.; Maehley, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, 2: 764-775, 1955.

Conkle, M. T.; Hodgskiss, P. D.; Nunnally, L. B. **Starch gel eletroforesis conifer seeds: a laboratory manual**. Berkerley, USDA: Forest Service, 1982. 18p.

Del Longo, O. T.; González, C. A.; Pastori, G. M.; Trippi, V. S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, 34(7):1023-1028, 1993.

Dhindsa, R. S.; Plumb-Dhindsa, P.; Thorpe, T. A. Leaf senescence: carrelated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. **Journal of Experimental Botany**, 32: 93-101, 1981.

Flores, R.; Gomes, P. R.; Faria, J. T. C.; Centellas, A. Q.; Fortes, G. R. L.; Peters, J. A. Calogênese *in vitro* de duas cultivares de morangueiro (*fragaria x ananassa*) a partir de discos foliares. **Revista Brasileira de Agrociência**, 4(1): 9-14, 1998.

Fontes, M. A.; Otoni, W. C.; Carolino, S. M. B.; Brommonschenkel, S. H.; Fontes, E. P. B.; Fári, M.; Louro, R. P. Hyperhydricity in pepper plants regenerated *in vitro*: involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. **Plant Cell Reports**, 19: 81-87, 1999.

Franck, T.; Crévecoeur, M.; Wuest, J.; Greppin, H.; Gaspar, T. Cytological comparison of leaves and stems of *Prunus avium* L. shoots cultured on a solid medium with Ágar or gelrite. **Biotechniques and Histochemistry**, 73: 32-43, 1997.

Franck, T.; Kevers, C.; Penel, C.; Greppin, H.; Hausman, J. F.; Gaspar, T. Reducing properties and markers of lipid peroxidation in normal and hyperhydrating shoots of *Prunus avium* L., **Journal of Plant Physiology**, 153: 339-346, 1998.

Giannopolitis, C. N.; Ries, S. K. Superoxide dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59(2): 309-314, 1977.

Havir, E. A.; McHale, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 84(2): 450-455, 1987.

Hendry, G. A. F.; Price, A. H. Methods of comparative study anatomy: stress indicators – chlorophylls and carotenoids. In: Hendry, G. A. F.; Grime, K. P. **Methods in comparative plant ecology**, London: Chapman e Hall, p.148 -152, 1993.

Jain, A.; Kantia, A.; Kothari, S. L. De novo differentiation of shoot buds from leaf-callus of *Dianthus caryophyllus* L. and control of hyperhydricity. **Scientia Horticulturae**, 87: 319-326, 2001.

Karnovsky, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27: 137-138, 1965.

Kevers, C.; Coumans, M.; Coumans-Gilles, M. F.; Gaspar, T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, 61: 69-74, 1984.

Leforestier, F.; Joseph, C.; Côme, D. Ethylene and vitrification of vitrification of *Fraxnus* explants *in vitro*. In: Pech, J. C. (Ed.) **Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene**, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.353-358. 1993.

Louro, R. P.; dos Santos, A. V.; Machado, R. D. Ultrastructure *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. L. shoots cultivated *in vitro* in multiplication and elongation-rooting media. **International Journal of Plant Sciences**, 160: 217-227, 1999.

Marin, 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**, 62: 663-670, 1988.

Miguens, F. C.; Louro R. P.; Machado, R. D. A scanning electron microscope study of normal and vitrified leaves from *Datura insignis* plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 32: 109-113, 1993.

Olmos, E.; Hellín, E. Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation shoots. **Scientia Horticulturae**, 75: 91-101, 1998.

Olmos, E.; Piqueras, A.; Martinez-Solano, J. R.; Hellin, E. The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydrated leaves of regenerated carnation plants. **Plant Science**. 130: 97-105, 1997.

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

Park, S. W.; Jeon, J. H.; Kim, H. S.; Park, Y. M.; Aswath, C.; Joung, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, 99: 199-205, 2004.

Passardi, F.; Cosio, C.; Penel, C.; Dunand, C. Peroxidases have more functions than a swiss army knife. **Plant Cell Reports**, 24: 255-265, 2005.

Peixoto, P. H. P. **Peroxidação de lipídios em membranas e tecidos de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) com tolerância diferencial ao alumínio**. Viçosa: UFV, 1997. 112 p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.

Pertel, J. **Efeito do condicionamento fisiológico na germinação, no vigor e nas alterações enzimáticas em sementes de café (*Coffea arabica* L.)**. Viçosa: UFV, 2001. 101p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.

Picoli, E. A. T.; Otoni, W. C.; Figueira, M. L., Carolino, S. M. B.; Almeida, R. S.; Silva, E. A. M.; Carvalho, C. R.; Fontes, E. P. B. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP Binding Protein). **Plant Science**, 160: 857-868, 2001.

Piqueras, A.; Cortina, M.; Serna, M. D.; Casas, J. L. Polyamines and hyperhydricity in micropropagated carnation shoots. **Plant Science**, 162: 671-678, 2002.

Piqueras, A.; Han, B. H.; Van Huylbroeck, J. M.; Debergh, P. C. Effect of different environmental conditions *in vitro* on sucrose metabolism and antioxidant enzymatic activities in cultured shoots of *Nicotiana tabacum* L. **Plant Growth Regulation**, 25: 5-10, 1998.

Pospíšilová, J.; Tichá, I.; Kadlecěk, P.; Haisel, D.; Plzáková, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Physiologia Plantarum** 42: 481-497, 1999.

Saher, S.; Piqueras, A.; Hellín, E.; Olmos, E. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, 120: 152-161, 2004.

Saher, S.; Piqueras, A.; Hellín, E.; Olmos, E. Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: implications of oxidative stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 81: 149-158, 2005.

Sciutti, R.; Morini, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**. 70: 221-228, 1995.

Siegel, B. Z. Plant peroxidase - an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, 12: 303-312, 1993.

Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2004. 719p.

Totola, M. R. **Cinética da fluorescência e atividade do sistema antioxidativo em plantas de eucalipto com micorrizas sob temperatura supra-ótima**. Viçosa: UFV, 1999. 86p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.

Yamauchi, N. Watada, A. E. Regulated chlorophyll degradation in spinach leaves during storage. **Journal of American Society for Horticultural Science**, 116: 58-62, 1991.

Werker, E.; Leshem, B. Structural changes during vitrification of carnation plantlets. **Annals of Botany**, 59: 377-385, 1987.

Williams, R. R.; Taji, 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**, 26: 1-6, 1991.

Ziv, M.; Ariel, T. On the relation between vitrification and stomatal cell wall deformity in carnation leaves *in vitro*. **Acta Horticulturae**, 314: 121-129, 1992.

Ziv, M.; Ariel, T. Vitrification in relation to stomatal deformation and malfunction in carnation leaves *in vitro*. In: Lumsden PJ, Nicholas J, Davies WJ (eds) **Physiology, growth and development of micropropagated plants**. Kluwer Academic Press, Dordrecht, p.143-154. 1994.

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

CAPÍTULO II

Efeito do BAP e de agentes gelificantes na ocorrência de hiperidricidade em videira (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) propagada *in vitro*

RESUMO

As técnicas de micropropagação constituem alternativa importante para a rápida multiplicação de plantas de videira, porém, expõem as plantas a diferentes tipos de estresses, que levam, algumas vezes, ao aparecimento de hiperidricidade. Com o objetivo de otimizar a propagação *in vitro* do porta-enxerto 'VR 043-43' de videira, com ênfase particular nos fatores envolvidos na hiperidricidade e na capacidade de multiplicação, e determinar o padrão de acúmulo de etileno no interior de frascos de cultivo no desenvolvimento de plantas normais e hiperídricas, segmentos nodais de plantas mantidas *in vitro* em meio com metade dos sais de MS foram transferidos para o mesmo meio ou para meio Q & L, acrescidos de Ágar (6,5 g L⁻¹) ou Phytigel[®] (2,5 g L⁻¹) e BAP (1,0 ou 2,0 mg L⁻¹). Foram mensurados os níveis de etileno aos 3, 7, 14, 20, 30 e 40 dias de cultivo e, após 35 dias, foram realizadas análises bioquímicas (SOD, CAT, POD, isoenzimas, peroxidação de lipídios, teores de clorofilas), ultra-estruturais (microscopia fotônica e eletrônica de varredura), além da análise das características morfológicas da hiperidricidade. A análise dos dados mostrou que: a) o aumento da concentração de citocinina levou ao desenvolvimento de hiperidricidade em brotos de videira; b) a substituição de Ágar por Phytigel[®] induziu maior formação de brotos hiperídricos; c) a adição de 2,0 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultivo induziu o estresse oxidativo, caracterizado por aumento da atividade de enzimas antioxidantes e da peroxidação de lipídios, diminuição de clorofilas, alterações em nível celular, como malformações de estômatos e desorganização do mesofilo, além de manutenção, por maior período de tempo, de altos níveis de produção de etileno no interior dos frascos de cultivo.

CHAPTER II

Effects from BAP and gelling agents upon the hyperhydricity occurrence in grapevine (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* L.) propagated *in vitro*

SUMMARY

The micropropagation techniques are an important alternative for the fast multiplication of grapevine plants. However, they expose the plants to different stress types, which sometimes lead to the hyperhydricity emergence. So, this study was carried out in order to optimizing the *in vitro* propagation of the grapevine rootstock 'VR 043-43', by emphasizing either the factors involved into hyperhydricity and multiplication capacity, as well as to determine the accumulation pattern of ethylene in the culture flasks in the development of both normal and hyperhydric plants, some nodal segments of the plants maintained *in vitro* in medium containing half the MS salts were transferred to the same medium or to the medium Q & L, added with Agar (6.5 g L⁻¹) or Phytigel[®] (2.5 g L⁻¹) and BAP (1.0 or 2.0 mg L⁻¹). The ethylene levels were measured at 3, 7, 14, 20, 30 and 40 days under culture. After 35 days, the following analyses were accomplished: biochemical (SOD, CAT, POD, isozymes, lipid peroxidation, chlorophyll contents), ultrastructural (light microscopy and scanning electronic microscopy), and the morphologic hyperhydricity characteristics as well. The data analysis showed: a) the increased concentration of cytokinin led to the hyperhydricity development in grapevine shoots; b) the substitution of Agar by Phytigel[®] induced higher formation of hyperhydric shoots; c) the addition of 2,0 mg L⁻¹ BAP to the culture medium induced the oxidative stress, that was characterized by increased activity of either the antioxidant enzymes and lipid peroxidation, decreased chlorophylls, alterations at cellular level such as stomata malformations and mesophyll disorganization, besides the maintenance of high ethylene production levels in the culture flasks for a longer time period.

1 INTRODUÇÃO

A produção de uvas apresenta grande valor econômico e social para nosso país, tanto para o consumo *in natura* quanto para a elaboração de vinhos e sucos. Com a vitivinicultura, cada vez mais tecnificada e industrial, impulsionada pela forte demanda de matéria-prima (uva para vinhos e sucos) e pelo aumento no consumo de vinhos de melhor qualidade, tem tornado o mercado atrativo e gerado grande procura por plantas matrizes e mudas certificadas para uso em novos plantios (Protas et al., 2002 citados por Borghezán et al., 2003).

No Brasil, o método mais empregado para a produção de uvas é o plantio de porta-enxertos para posterior enxertia das variedades de interesse. De acordo com Dzazio et al. (2002), a formação do vinhedo por esse método, apesar de ser de baixo custo, leva, no mínimo dois anos e favorece a disseminação de doenças.

O porta-enxerto de videira 'VR043-43' é um híbrido proveniente do cruzamento de *Vitis vinifera* e *Vitis rotundifolia*. Este apresenta elevada resistência ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* e à filoxera, alta tolerância à pérola-da-terra e uma quase imunidade a alguns nematóides (Borghezán et al., 2003). Neste contexto, as técnicas de micropropagação, nas quais brotações axilares ou adventícias são regeneradas *in vitro*, formando plantas inteiras, constituem uma alternativa importante para a rápida multiplicação das plantas e obtenção de matrizes livres de vírus (Biasi et al., 1998).

Porém, durante o cultivo *in vitro*, as plantas são expostas a condições de estresse causadas por injúrias durante o cultivo, alta osmoticidade do meio, elevada umidade relativa e acúmulo de gases na atmosfera de cultivo, além de altas concentrações de agentes de crescimento, como as citocininas (Franck et al., 2001). Essas condições especiais levam algumas plantas a desenvolverem folhas e brotos de aspecto translúcido ou vítreo, com engrossamento de entrenós e que dificilmente sobrevivem às fases de aclimatização. Estes sintomas são formalmente descritos pelo termo hiperidricidade, que é responsável por cerca de 60% das perdas na micropropagação (Piqueras et al., 2002; Olmos e Hellin, 1998).

Este fenômeno influencia a fotossíntese, a transpiração e as trocas gasosas, além de induzir mudanças na síntese protéica, afetando caminhos metabólicos interrelacionados (Fontes et al., 1999). Folhas de brotos hiperídricos são grossas, alongadas, enrugadas e frágeis. Anatomicamente, possuem redução do parênquima paliçádico, estômatos irregulares, degeneração de cloroplastos e uma fina cutícula (Olmos e Hellin, 1998).

O estresse oxidativo também está presente em plantas hiperídricas, com aumento da atividade dos sistemas enzimáticos antioxidantes e aumento da peroxidação de lipídios (Franck et al. 2001).

Diante do exposto, este trabalho objetiva otimizar a propagação *in vitro* do porta-enxerto 'VR 043-43' de videira, com ênfase particular nos fatores envolvidos na hiperidricidade e na capacidade de multiplicação e monitorar o padrão de acúmulo de etileno no interior de frascos de cultivo no desenvolvimento de plantas normais e hiperídricas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas neste estudo plantas do porta-enxerto 'VR 043-43', gentilmente cedidas pelo Laboratório de cultura de tecidos da UFPR e mantidas *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos da UFV, em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio com metade dos sais de MS, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 6,5 g L⁻¹ de Ágar (Merck, Alemanha). As culturas foram incubadas em sala de crescimento a 25± 2°C, sob fotoperíodo de 16 h e irradiância de 36 µmol m⁻² s⁻².

A fim de determinar as melhores condições de cultivo para obtenção de plantas normais e hiperídricas, segmentos de entrenós contendo uma folha foram transferidos, sob condições assépticas, para frascos de vidro (240 mL de capacidade) contendo 30 mL de meio Q & L (Quoirin e Lepoivre, 1977) ou meio com metade dos sais MS (Murashige e Skoog, 1962) (MS/2), com as mesmas concentrações de sacarose e mio-inositol, e acrescidos dos agentes gelificantes, Ágar (Merck) a 6,5 g L⁻¹ ou Phytigel® (Sigma Chemical Company, EUA) a 2,5 g L⁻¹ e de BAP em diferentes concentrações. Os meios correspondentes aos tratamentos T1, T3 e T5 receberam as

concentrações de 0,0; 1,0 e 2,0 e mg L⁻¹ de BAP, respectivamente, e foram solidificados com Ágar, ao passo que os tratamentos T2, T4 e T6, nas mesmas concentrações de BAP, foram solidificados com Phytigel® (Quadro 1). Os frascos foram tampados com filme plástico transparente de PVC (Goodyear, Brasil) e as culturas, acondicionadas em sala de crescimento.

As avaliações das características morfológicas de hiperidricidade foram realizadas a cada três dias, após a primeira semana de cultivo e, ao final do experimento (43 dias), foram obtidas amostras para análises bioquímicas, anatômicas, de clorofila e etileno.

A unidade experimental foi composta por 1 frasco com 4 segmentos de entrenós. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e 5 repetições por tratamento.

Os dados foram analisados por testes de comparação múltipla de médias de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Quadro 1. Diferentes combinações de BAP e de agentes gelificantes utilizados na regeneração de videira *in vitro*

Tratamento	BAP (mg L ⁻¹)	Agente gelificante
T1	0,0	Ágar
T2	0,0	Phytigel
T3	1,0	Ágar
T4	1,0	Phytigel
T5	2,0	Ágar
T6	2,0	Phytigel

2.1 Análise das características morfológicas da hiperidricidade

A cada 3 dias, após a primeira semana de cultivo, foram feitas avaliações quanto ao surgimento de características morfológicas de hiperidricidade. Ao final do experimento (43 dias), foram registrados: massa fresca da planta inteira, da parte aérea, do calo formado e da raiz, número

de brotações, número de folhas totais e hiperídricas, comprimento da parte aérea e da raiz e diâmetro de calo.

2.2 Análises anatômicas e ultra-estruturais

Para as análises estruturais e ultra-estruturais, foram empregadas lâminas foliares completamente expandidas, as quais foram fixadas de acordo com Karnovsky (1965).

As amostras destinadas às análises de microscopia fotônica foram, em seguida, submetidas a vácuo por 24 horas e lavadas na solução-tampão fosfato de potássio 0,05M por 30 minutos. Após, foram desidratadas em série etílica, emblocadas em historresina e polimerizadas por 15 horas a 70 °C. Os exemplares foram cortados a 60 nm de espessura com navalha de aço descartável em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 – Leica). Os cortes foram corados com azul de toluidina em meio ácido e as lâminas, montadas em resina sintética Permount. As observações foram realizadas em fotomicroscópio (Modelo AX70TRF, Olympus optical, Tokyo, Japão) equipado com sistema U-photo (Olympus, Japão), localizado no Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Biologia Vegetal – UFV.

As amostras destinadas à microscopia eletrônica de varredura foram desidratadas em série etílica, até álcool absoluto. Após, foram submetidas à secagem em ponto crítico com CO₂ líquido (Bozzolla e Russel, 1992), utilizando equipamento Balzers (Modelo CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), fixadas em “stubs” e submetidas à deposição metálica com ouro, por pulverização catódica em equipamento Balzers de congelamento a seco (Modelo FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein) acoplado ao conjunto de pulverização catódica (Modelo SCA 010). As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (Modelo 1430VP, LEO), instalado no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

2.3 Análises bioquímicas

O extrato enzimático bruto para a determinação da atividade de peroxidase, catalase e dismutase do superóxido foi obtido pela homogeneização de 0,5 g de tecidos da parte aérea (congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C) com 4 mL de solução de extração (EDTA 0,1 mM em tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8), em almofariz de porcelana. Os fragmentos de células foram removidos por centrifugação a 12000g por 20 minutos, utilizando o sobrenadante como fonte de proteínas, de acordo com metodologia descrita por Saher et al. (2004). Todas as etapas necessárias ao processo foram executadas a 4 °C.

Peroxidase (POD EC1.11.1.7)

A atividade de PODs nos tecidos foliares foi determinada espectrofotometricamente a 25 °C, pelo aumento da absorbância a 470 nm, a partir da reação de 100 µL do extrato enzimático bruto diluído a 1:4 (v/v) com água desionizada em uma mistura de reação contendo 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5, 0,5 mL de guaiacol e 0,4 mL de H₂O₂ 0,59 M, em um volume total de 3 mL (Chance e Maehley, 1955). Os resultados foram expressos em mmoles de POD min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Catalase (CAT EC1.11.1.6)

A atividade das CATs nos tecidos foi determinada após a adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,9 ml do meio de reação constituído de 500 µL de H₂O₂ 59 mM, 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0 e 400 µL de água desionizada a 30 °C (Havir e McHale, 1987). A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm e expressa em mmoles de CAT min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Dismutase do Superóxido (SOD EC1.15.1.1)

À mistura de reação, constituída de 0,3 mL de metionina 130 µM, 0,1 mL de azul de p-nitrotetrazólio (NBT) 2250 µM, 0,1 mL de EDTA 3 µM, 0,2 mL de riboflavina, 0,75 mL de água desionizada e 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM em pH 7,8 (Del Longo et al., 1993), adicionaram-se 100 µL

do extrato enzimático bruto. A reação foi conduzida a 25 °C, em tubos de ensaio dispostos em orifícios eqüidistantes de uma lâmpada fluorescente de 15 W, colocada no centro de uma câmara de incubação circular e foi iniciada pela ligação da lâmpada fluorescente. Após 15 min, o desligamento da lâmpada interrompeu a reação, sendo a produção de formazana azul medida pela determinação do incremento na absorbância a 560 nm, que foi subtraído de um “branco”, no qual não havia extrato enzimático. Nestas condições, uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Giannopolitis e Ries, 1977; Totola, 1998).

Quantificação de proteínas

As determinações da quantidade de proteína presente nos referidos extratos foram feitas pelo método de Bradford (1976), usando soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

Peroxidação de lipídeos

A peroxidação dos lipídios foi medida pela determinação da quantidade formada de malonaldeído (MDA), um produto final da peroxidação dos lipídios, utilizando-se o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por Buege e Aust (1978). Tecidos da parte aérea (MF) pesando 100 mg foram homogeneizados em 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) em almofariz de porcelana, na presença de polivinilpolipirrolidona (PVPP) na proporção de 1:1,5 (MF:PVPP). O homogenato foi centrifugado por 30 min a 4000 g. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4°C. Em seguida, alíquotas de 1 ml dos sobrenadantes foram adicionadas a 4 ml da mistura contendo 10% (p/v) de TCA (ácido tricloroacético), 0,5% (p/v) de TBA (ácido tiobarbitúrico) e 0,01% (p/v) de BHT (butilhidroxitolueno). Os tubos de ensaio foram fechados e incubados em banho-maria por 15 minutos a 95 °C, sob agitação. A reação foi interrompida pela transferência dos tubos de ensaio para banho de gelo. A absorbância dos sobrenadantes foi lida a 535 e 600 nm. A quantidade formada do complexo MDA-TBA foi determinada

utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Dhindsa et al., 1981).

Isoenzimas

Para análise isoenzimática, foram utilizadas amostras de folhas normais e hiperídricas previamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Para a extração, cerca de 100 mg de tecido por mL de solução-tampão foram macerados utilizando almofariz e pistilo, previamente congelados e mantidos sobre barras de gelo (Arimura, 1997).

Os sistemas isoenzimáticos foram caracterizados pela técnica de eletroforese horizontal em géis de amido de milho a 12% (p/v) em solução tampão (Conkle et al., 1982).

No preparo do gel, foram empregados 350 mL de solução-tampão, dos quais 80 mL foram vertidos em um balão volumétrico de 1000 mL e levados à fervura em fogo brando. Imediatamente após a fervura, o conteúdo do balão volumétrico foi vertido no Erlenmeyer e este retornado à chama, para o cozimento do amido. Em seguida, o conteúdo do Erlenmeyer foi vertido em uma forma de acrílico ($17,0 \times 14,0 \times 1,0 \text{ cm}$) sobre a qual se colocou uma placa de vidro pré-aquecida a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, com a finalidade de se uniformizar a superfície do gel. Os géis foram preparados à tarde e deixados à temperatura ambiente até a manhã do dia seguinte. Em seguida, foram resfriados a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por uma hora em câmara fria, antes da condução da eletroforese.

Para aplicação das amostras e corrida eletroforética, retirou-se a placa de vidro e a cerca de 2,5 cm da extremidade fez-se um corte perpendicular, afastando a menor porção do gel. O tecido vegetal macerado foi aplicado em uma tira de papel cromatográfico Whatman 3 MM ($12 \times 5 \text{ mm}$), com auxílio de uma pinça, para absorção do filtrado. As amostras absorvidas pelas tiras de papel foram colocadas ao longo da face cortada do gel maior, cobrindo completamente sua espessura. Aplicou-se a solução de azul de bromofenol em tira própria, para monitorar a migração. Em seguida, foi apoiado o suporte do gel sobre as cubas e conectado o gel às cubas dos eletrodos, mediante uma ponte de pano (tipo Perfex) previamente embebida na solução tampão, para cada sistema enzimático.

Fez-se uma pré-corrída eletroforética durante 15 minutos a 150 volts, a fim de que as proteínas fossem liberadas das tiras de papel Whatman 3 MM para o gel. Desligou-se o aparelho, desconectou-se o gel das cubas e removeu-se as tiras com auxílio de pinça cirúrgica. Em seguida, conectou-se o gel às cubas e ligou-se o aparelho novamente a 200 volts, segundo metodologia utilizada por Arimura (1997).

Após a corrida eletroforética, o gel foi cortado em fatias, com auxílio de guias e mediante o uso de um fio de nylon. As fatias dos géis foram, então, colocadas sobre bandejas refratárias tipo Pyrex e, sobre elas, foram vertidas as soluções com os substratos específicos para cada sistema enzimático, conforme Borsoi Filho (1995).

Para o sistema peroxidase (POD), as bandejas refratárias foram colocadas em câmara fria a 4 °C, até o aparecimento das bandas isoenzimáticas. Já para os sistemas isoenzimáticos esterase (EST), malato desidrogenase(MDH) e álcool desidrogenase (ADH), as bandejas refratárias foram colocadas em estufa à temperatura de 37 °C, no escuro até o aparecimento das bandas isoenzimáticas. Em seguida, as soluções reveladoras foram descartadas pela passagem de água corrente e os padrões das bandas nos géis foram fixados, durante 12 horas em câmara fria a 4 °C, com uma solução com 10% (v/v) de glicerina. Após este período, a solução de glicerina foi removida e substituída por uma solução com 65% de álcool etílico, 30% de água e 5% de glicerina, durante 5 minutos, com o objetivo de se desidratarem os géis. Imediatamente após, os géis foram secados pelo método do bastidor e armazenados em papel-toalha. A avaliação das bandas foi feita de acordo com a sua intensidade.

2.4 Análise de clorofila

A análise dos teores de clorofila foi realizada aos 43 dias de cultivo, utilizando plantas normais e hiperídricas de videira. Amostras de 100mg de folhas foram maceradas em almofariz com acetona 80% (v/v) e areia lavada e filtradas em papel-filtro. Após a primeira filtração, o papel de filtração foi lavado com acetona 80 % (V/V), para retirar o resíduo de material. Em

seguida o volume do balão foi completado para 25 mL e foram determinadas as absorvâncias a 645 e 663 nm (Hendry e Price,1993).

2.5 Mensuração de etileno nos frascos de cultivo

Para a determinação da concentração de etileno acumulado no interior dos frascos de cultivo, ao longo do desenvolvimento dos brotos, segmentos de entrenós contendo uma folha, sob condições assépticas, foram transferidos para frascos de vidro (360 mL de capacidade) contendo 30 mL de meio com metade dos sais de MS, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, solidificado com 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel® (Sigma Chemical Company, EUA) e acrescido de 2,0 mg.L⁻¹ de BAP (meio indutor de hiperidricidade) ou sem adição de BAP (meio não indutor de hiperidricidade - controle), sendo o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120 °C e 1,1 Pa por 20 minutos.

Os frascos foram tampados com duas camadas de filme plástico transparente de PVC (Goodyear®, Brasil), no qual foram fixados septos de silicone para retirada das amostras da atmosfera interna, e as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹.

Com auxílio de uma seringa de 1 cm³ com agulha tipo 29G de ½ polegada (B-D, Becten Dickinson Company, EUA), 1 mL do ambiente interno dos frascos foi retirado e utilizado como fonte de amostras para mensuração do etileno acumulado. Após retiradas as amostras, os frascos foram abertos em câmara de fluxo laminar, por 30 minutos, para permitir as trocas gasosas com o meio externo sendo, então, vedados novamente e levadas à sala de crescimento. Ao final de 24 horas, eram retiradas novas amostras para a determinação da concentração de etileno produzido em 24 horas, durante este intervalo de mensuração.

As avaliações foram realizadas após 3, 7, 14, 20, 30 e 40 dias de cultivo. A unidade experimental foi composta por 1 frasco com 4 ramos. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados no tempo, sendo as repetições escolhidas por meio de sorteio, com 5

repetições por tratamento, em arranjo fatorial 2 x 6 (2 meios de cultivo – indutor e não indutor de hiperidricidade x 6 períodos de avaliação).

A mensuração dos níveis de etileno foi realizada no Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas da Universidade Federal de Viçosa. Utilizou-se cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5890, séries II, equipado com coluna de aço inoxidável empacotada com Poropak-Q (80 – 100 mesh), de 3,2 mm de diâmetro interno e 1,5 m de comprimento, tendo como fase móvel o nitrogênio, com fluxo de 30 mL s⁻¹. As temperaturas da coluna, do injetor e do detector eram mantidas em 60, 75 e 135 °C, respectivamente. O etileno acumulado foi expresso em nmol g⁻¹ de matéria fresca e a taxa de produção, em pmol h⁻¹ g⁻¹ de matéria fresca.

3 RESULTADOS

3.1 Análise das características morfológicas da hiperidricidade

Os primeiros sintomas de hiperidricidade foram observados 10 dias após o subcultivo no tratamento 6 (MS/2), com o surgimento de superfície frágil e translúcida e calejamento na base dos ramos. Apesar da alta taxa de indução de gemas, estas não alongaram, dando origem a brotações tipo roseta (Figura 1). A percentagem de hiperidricidade, em todas as condições de cultivo, é apresentada na Tabela 1. A condição hiperídrica progrediu até aproximadamente o 27º dia, quando a percentagem de hiperidricidade nos tratamentos se estabilizou e os brotos hiperídricos mostravam todas as características dessa desordem fisiológica (Figura 1).

Os dois meios utilizados não apresentaram diferenças significativas quanto à formação de hiperidricidade (Tabela 1), sendo que esta aumentou proporcionalmente à concentração de BAP, no meio MS/2. A taxa de hiperidricidade foi aumentada ao se substituir Ágar por Phytigel[®], em todos os tratamentos, embora diferenças significativas tenham sido observadas apenas no meio MS/2 (Tabela 1).

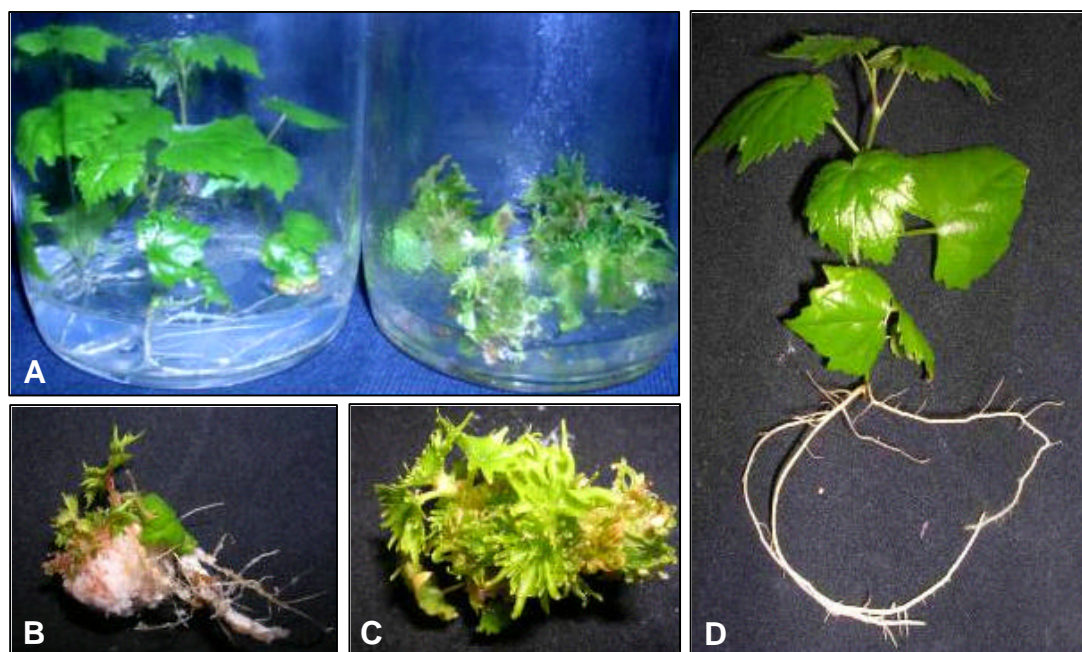


Figura 1. Aspecto das brotações do porta-enxerto de videira 'VR 043 – 43'. (A) Comparação entre o desenvolvimento de explantes em meio não indutor (esquerda) e indutor (direita) de hiperidricidade; (B) Detalhe do calogênese na base dos explantes hiperídricos; (C) planta hiperídrica característica e (D) planta de videira normal.

Tabela 1. Percentagem de hiperidricidade em plantas de videira cultivadas em diferentes concentrações de BAP, com Ágar ou Phytigel® como agente gelificante, em meio de cultura MS/2 ou Q & L

BAP (mg L ⁻¹)	Agente Gelificante	Hiperidricidade (%)	
		Q&L	MS/2
0,0	Ágar	0,00 b A	0,00 e A
	Phytigel	0,00 b A	0,00 e A
1,0	Ágar	55,00 a A	31,25 d A
	Phytigel	60,00 a A	58,33 c A
2,0	Ágar	85,00 a A	75,00 b A
	Phytigel	93,75 a A	100,00 a A

Q & L: Quoirin e Lepoivre (1977)

MS/2: Murashige e Skoog (1962) em metade de sua força.

Médias com as mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A influência do meio de cultivo, das concentrações de BAP e do agente gelificante no número de folhas e desenvolvimento de brotações está mostrada na Tabela 2. Devido ao surgimento de plantas hiperídricas, com entrenós muito engrossados e sem alongamento das brotações, formou-se uma estrutura em forma de roseta na base dos explantes, impedindo, dessa forma, a contagem exata do número de brotações por explante. Portanto, para esse parâmetro da avaliação, foram atribuídas notas, onde: '-' foi para o desenvolvimento apenas da brotação principal; '+' para baixo número de brotações; '++' para moderado número de brotações e '+++' para alto número de brotações (Tabela 2). A maior formação de brotos por explante foi encontrada nos meios com presença de BAP, não havendo diferenças no comportamento dos dois meios de cultivo utilizados (Tabela 2). Ao substituir Ágar por Phytigel[®] no meio de cultivo com 2 mg L⁻¹ de BAP, as brotações multibrotaram e tiveram alongamento comprometido, o que dificultou a quantificação dos mesmos.

O número de folhas formadas também foi incrementado na presença de BAP (Tabela 2). O maior incremento se deu com 2 mg L⁻¹, nos dois meios utilizados. Para nenhuma das concentrações de BAP foi verificada diferença significativa entre Ágar e Phytigel[®]. Entretanto, pode-se observar que no meio sem BAP, pequena diminuição no número de folhas na presença de Phytigel[®]. Na presença de BAP, em meio Q & L, também houve essa diminuição. Entretanto, no meio MS meia força, o contrário foi observado, com o aumento do número de folhas por explante mediante a substituição do Ágar por Phytigel[®].

Na Tabela 3, são mostrados os dados de altura e massa fresca da parte aérea. A altura das brotações diminuiu à medida que aumentou a concentração de BAP no meio de cultivo (Tabela 3). Na presença de Phytigel[®], essa redução foi ainda maior (Tabela 3). Porém, o ganho de massa fresca sofreu influência do agente gelificante e teve comportamento diferente entre os dois meios utilizados. Dessa forma, no meio Q & L, os maiores ganhos foram nos tratamentos com 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP, solidificado com Ágar, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Já no meio MS/2, um incremento na massa fresca foi observado com o

aumento da concentração de BAP, sendo esse incremento, maior na presença de Phytigel[®] que na presença de Ágar (Tabela 3).

Tabela 2. Efeito da concentração de BAP, do tipo de agente gelificante e do meio de cultivo no número de folhas totais e desenvolvimento de brotações em segmentos nodais do porta-enxerto VR043 - 43, após 43 dias de cultivo

BAP (mg L ⁻¹)	Agente gelificante	Número de folhas		Brotações	
		Q&L	MS/2	Q&L	MS/2
0,0	Ágar	23 b A	23 c A	-*	-
	Phytigel	16 b A	20 c A	-	-
1,0	Ágar	71 a A	29 bc B	++	+
	Phytigel	46 ab A	44 b A	+	+
2,0	Ágar	83 a A	66 a A	++	++
	Phytigel	78 a A	70 a A	+++	+++

Q & L: Quoirin e Lepoivre (1977)

MS/2: Murashige e Skoog (1962) em sua metade da força.

*- somente a brotação principal; + baixo número de brotações; ++ moderado número de brotações; +++ alto número de brotações.

Médias com as mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Influência da concentração de BAP e do tipo de agente gelificante, em meio MS/2 ou Q & L na altura e massa fresca de brotações axilares de videira

BAP (mg L ⁻¹)	Agente Gelificante	Altura PA (cm)		Massa Fresca PA (g)	
		Q&L	MS/2	Q&L	MS/2
0,0	Ágar	5,41 a A	4,53 a A	0,72 b A	0,51 b A
	Phytigel	4,43 ab A	4,56 a A	0,30 b A	0,57 ab A
1,0	Ágar	4,37 ab A	2,72 b A	1,43 a A	0,44 b B
	Phytigel	3,63 ab A	2,69 b A	0,47 b A	0,67 ab A
2,0	Ágar	3,05 ab A	2,17 b A	1,26 a A	0,89 ab A
	Phytigel	2,69 b A	1,97 b A	0,59 b A	1,06 a A

Q & L: Quoirin e Lepoivre (1977)

MS/2: Murashige e Skoog (1962) em sua metade da força.

Médias com as mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A influência dos meios de cultivo utilizados e do aumento da concentração de BAP em presença de Ágar ou Phytigel® no tamanho médio de raízes ou de calo, formados nas brotações de videira pode ser observada na Tabela 4. Na ausência de BAP, não houve desenvolvimento das brotações, verificando-se elevada propensão à rizogênese na base dos explantes. Entre o meio básico MS meia força e o meio Q & L, contendo Ágar ou Phytigel® como agente gelificante, não houve diferença significativa quanto ao tamanho das raízes (Tabela 4). Na presença de BAP, houve significativa diminuição na formação de raízes e aumento na calogênese na base dos explantes, em relação aos tratamentos sem BAP, com exceção do meio Q & L com 1 mg L⁻¹ de BAP semi-sólido com Ágar, onde a formação de raízes não diferiu significativamente dos demais tratamentos. O aspecto dessas raízes, bem como dos calos formados, são mostrados na Figura 1.

Tabela 4. Rizogênese e calogênese de brotações axilares de videira em meio com metade dos sais de MS e Q&L solidificados com Ágar e Phytigel®, acrescidos de diferentes concentrações de BAP

BAP (mg L ⁻¹)	Agente gelificante	Comprimento de Raiz (cm)		Diâmetro de calo (mm)	
		Q&L	MS/2	Q&L	MS/2
0,0	Ágar	9,88 a A	11,08 a A	0,00 b A	0,00 b A
	Phytigel	11,19 a A	11,53 a A	0,00 b A	0,00 b A
1,0	Ágar	4,30 ab A	3,60 b A	10,91 a A	9,70 a A
	Phytigel	0,00 b A	4,00 b A	12,51 a A	11,77 a A
2,0	Ágar	0,85 b A	1,00 b A	11,60 a A	10,75 a A
	Phytigel	1,00 b A	1,40 b A	10,97 a A	10,03 a A

Q & L: Quoirin e Lepoivre (1977)

MS/2: Murashige e Skoog (1962) em metade de sua força.

Médias com as mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2 Análises anatômicas e ultra-estruturais

As folhas do porta-enxerto de videira 'VR043-43' são anfiestomáticas, com maior número de estômatos na face abaxial. Os estômatos, geralmente,

se situam no mesmo plano ou ligeiramente acima das células epidérmicas, sendo mais proeminentes na face abaxial.

Os estômatos de plantas não hiperídricas encontram-se ligeiramente acima linha da epiderme e apresentaram morfologia normal, com células-guarda em forma elíptica apresentando borda cuticular típica na parede interna da célula-guarda, junto aos ostíolos (Figura 3). Nas amostras de plantas hiperídricas os estômatos encontram-se elevados em relação à epiderme (Figura 2B, D, F, H e I) e são não-funcionais, com células-guarda maiores que as de plantas não hiperídricas, com ausência de cristas cuticulares e com a parede celular que delimita o poro estomático protraída e, muitas vezes, rompida, resultando na deformação da célula-guarda (Figura 3B, D, F, H) e, conseqüentemente, causando irregularidades ou corrugações na epiderme (Figura 2B, D, F, H, I)

As plantas normais caracterizaram-se por apresentarem estrutura dorsiventral bem definida (Figura 2A, C e E), estando o parênquima paliçádico formado por uma única camada de células, ocupando, aproximadamente, metade da espessura do mesofilo; o lacunoso, por sua vez, com duas ou três camadas largas de células, apresenta poucos espaços intercelulares (Figura 2A e B). À medida que a concentração de BAP foi aumentando, observou-se redução gradual na delimitação entre parênquimas paliçádico e lacunoso, formando células arredondadas e hipertrofiadas, com aparente incremento nas larguras das lâminas e redução na expansão das mesmas (Figura 2B, D, F, H).

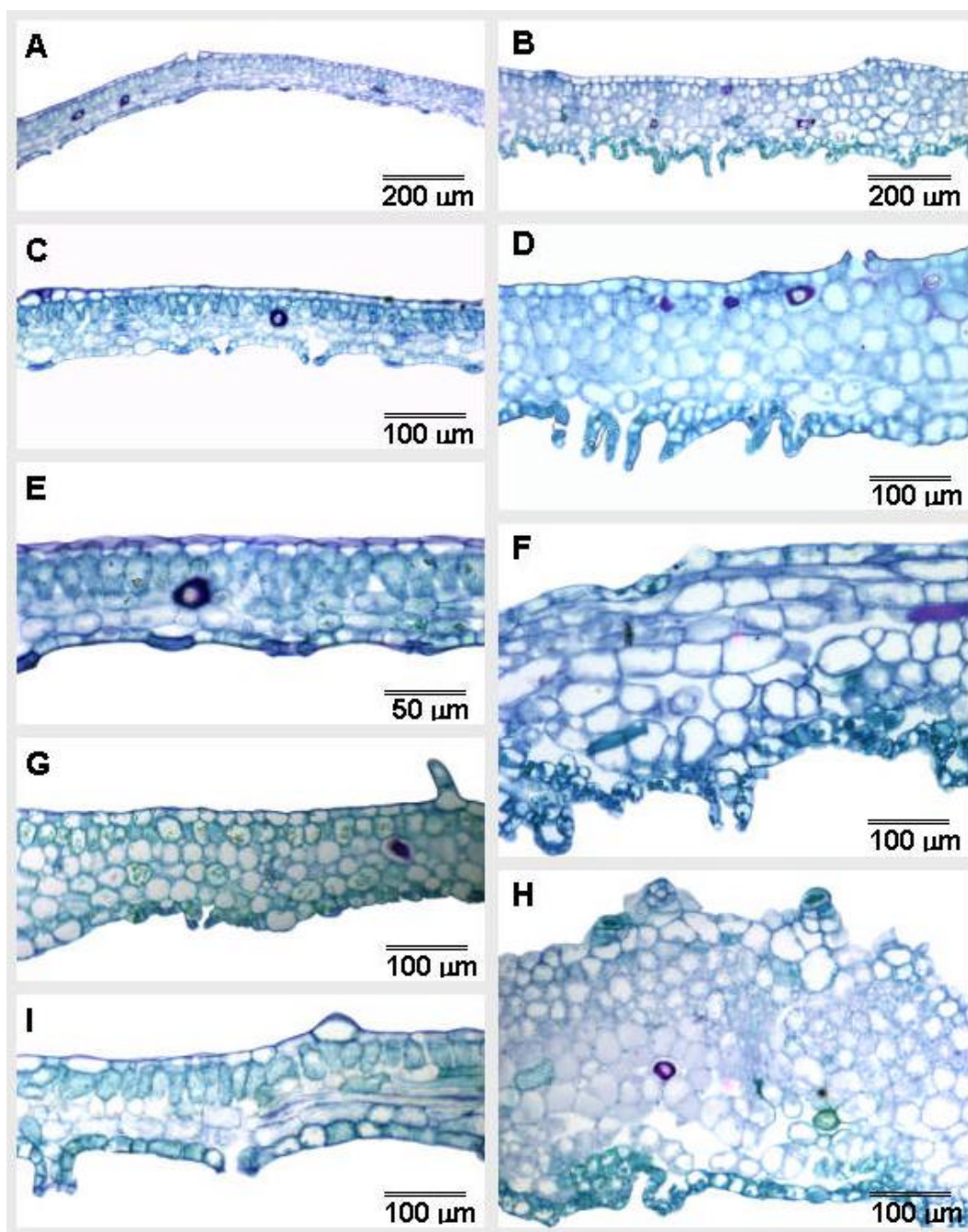
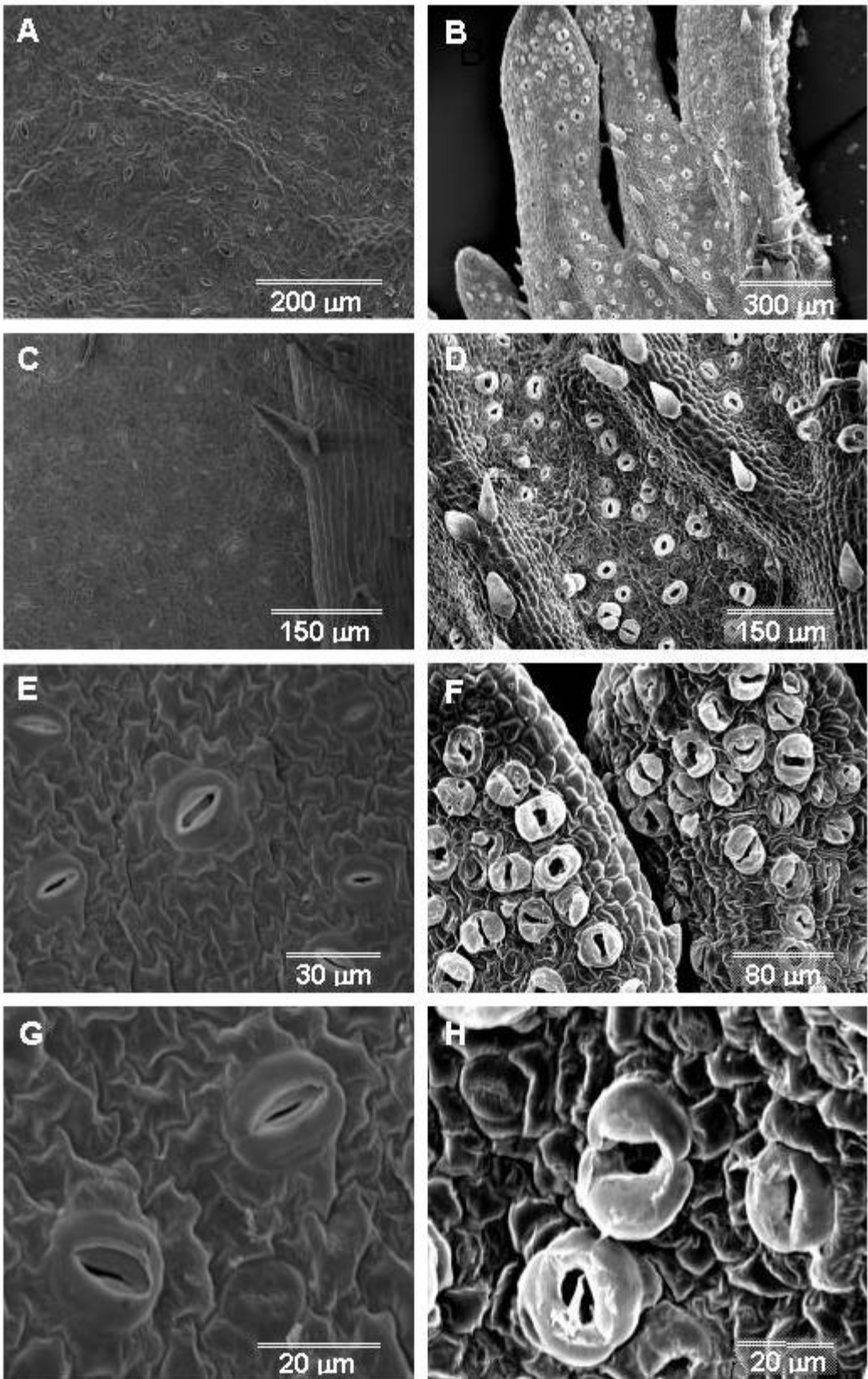


Figura 2. Seções transversais das folhas de videira (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* L.) normal (A, C e E), propagada *in vitro* em meio na ausência de reguladores de crescimento, e hiperídrica (B, D, F, H e I) propagados *in vitro* em meio de cultivo com 1 mg L⁻¹(G), 2 mg L⁻¹ (I) e 3 mg L⁻¹ BAP (B, D, F e H) coradas com Azul de Toluidina. Notar a evidente perda da característica dorsiventral das folhas dos tratamentos controle (A, C e E) à medida que a concentração da citocinina no meio é aumentada, atingindo graus de hiperidricidade elevados em D, F e H, com evidente diferenciação anormal de estômatos e a deformação da epiderme abaxial.

Figura 3. Eletromicrografias de varredura da superfície abaxial de folhas do porta-enxerto videiras (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* L. 'VR043-43') normais (A, C, E e G) e hiperídricas (B, D, F e H) propagados *in vitro* em meio de cultivo com 3 mg L⁻¹ BAP. (A e C) Folha de videira evidenciando estômatos normais com contorno elíptico das células-guardas; (B e D) Folha de videira evidenciando estômatos na região internerval mal-formados, volumosos e notadamente diferenciados acima do nível das células epidérmicas; (E e G). Detalhes de estômatos de videira evidenciando a normalidade de diferenciação dos mesmos; (F e H) Detalhes de estômatos anormais, típicos da condição hiperídrica, com células-guarda volumosas e arredondadas e células epidérmicas colapsadas.



3.3 Análises bioquímicas

O efeito do BAP e dos agentes gelificantes sobre a atividade enzimática em tecidos da parte aérea de videira pode ser observado na Tabela 5. A atividade de peroxidases foi aumentada na presença de BAP, porém esse aumento só foi significativo na presença de 2 mg L⁻¹ de BAP no meio. Nesta concentração de regulador de crescimento, a atividade de peroxidases nos tecidos, em presença de Phytigel[®] como agente gelificante, foi significativamente maior que na presença de Ágar.

A atividade da catalase aumentou significativa e proporcionalmente ao aumento da concentração de BAP no meio de cultivo, com ambos agentes gelificantes. Porém, assim como para peroxidases, esse aumento só foi significativo na presença de 2 mg L⁻¹ de BAP. A atividade de catalases observada nos brotos cultivados com Phytigel[®] não diferiu significativamente da determinada na presença de Ágar em nenhum dos tratamentos com BAP ou no controle (Tabela 5).

Ao se adicionar 1 mg L⁻¹ de BAP no meio de cultivo, observou-se um incremento significativo na atividade de superóxido dismutase (SOD). Essa atividade teve uma pequena diminuição no meio com 2 mg L⁻¹ de regulador de crescimento, mas não diferiu significativamente da concentração anterior. Dessa forma, a atividade dessa enzima não seguiu o mesmo padrão da peroxidase e catalase, cujas atividades foram aumentadas na concentração de 2 mg L⁻¹ de BAP (Tabela 5).

O padrão de peroxidação de lipídios em tecidos de videira, submetidos a diferentes concentrações de BAP, com Ágar ou Phytigel[®] como agentes gelificantes, pode ser observado na Tabela 6. Na presença de Ágar não houve aumento significativo na formação do complexo MDA-TBA e, conseqüentemente, na peroxidação dos lipídios. Esse aumento só foi observado na presença de 2 mg L⁻¹ de BAP em meio semi-sólido com Phytigel[®]. Tanto na ausência de BAP quanto nas duas concentrações estudadas de regulador de crescimento, não houve diferenças significativas entre os agentes gelificantes utilizados, embora na presença de Phytigel seja possível observar, nos tratamentos com 0,0 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP, uma maior formação do complexo MDA-TBA.

Tabela 5. Atividade enzimática em videira aos 43 dias de cultivo em meio MS meia força, solidificado com Ágar ou Phytigel®, em diferentes concentrações de BAP

BAP (mg L ⁻¹)	Atividade enzimática ¹					
	POD ²		CAT		SOD	
	Ágar	Phytigel	Ágar	Phytigel	Ágar	Phytigel
0,0	11,35 b A	13,37 b A	0,07 b A	0,08 b A	55,48 b B	157,14 b A
1,0	12,43 b A	13,37 b A	0,11 ab A	0,09 ab A	267,29 a A	363,56 a A
2,0	17,77 a B	26,29 a A	0,16 a A	0,20 a A	207,35 a A	317,85 a A

¹ Médias acompanhadas de mesma letra maiúscula em uma mesma linha e minúscula em uma mesma coluna, para cada enzima, não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

² PODs - Peroxidases (mmoles min⁻¹ mg⁻¹ MF).

CATs - Catalases (mmoles min⁻¹ mg⁻¹ MF).

SODs - Dismutases do superóxido (unidades de SOD min⁻¹ g⁻¹ MF).

Tabela 6. Efeito do BAP e de agentes gelificantes sobre a peroxidação dos lipídios em tecidos da parte aérea de videira aos 43 dias de cultivo

BAP (mg L ⁻¹)	Peroxidação de lipídios (nmoles de MDA-TBA g ⁻¹ MF)	
	Ágar	Phytigel
0,0	0,823 a A	0,994 b A
1,0	1,278 a A	1,051 ab A
2,0	1,954 a A	2,353 a A

¹ Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada concentração de BAP, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os géis relativos aos sistemas isoenzimáticos ADH, MDH, POD e EST em videira são mostrados na Figura 4. A migração das bandas ocorreu no sentido do pólo positivo, exceto a POD que migrou também ao pólo negativo. Apesar de se tratar de propagação clonal, os demais sistemas apresentaram variação de presença ou mesmo de intensidade das bandas obtidas.

Notadamente, para POD (Figura 4), houve marcante variação no tamanho e na intensidade de coloração das bandas formadas após migração para ambos os pólos, nos tratamentos em que os explantes foram cultivados em meios suplementados com 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP (T3, T4, e T6).

Semelhantemente, os sistemas EST, ADH e MDH (Figura 4C) apresentaram maior intensidade de bandas naqueles tratamentos em que o BAP foi acrescido aos meios. O tratamento com 2,0 mg L⁻¹ de BAP associado ao Ágar (T5) apresentou menor intensidade nas bandas de todos os sistemas enzimáticos estudados.

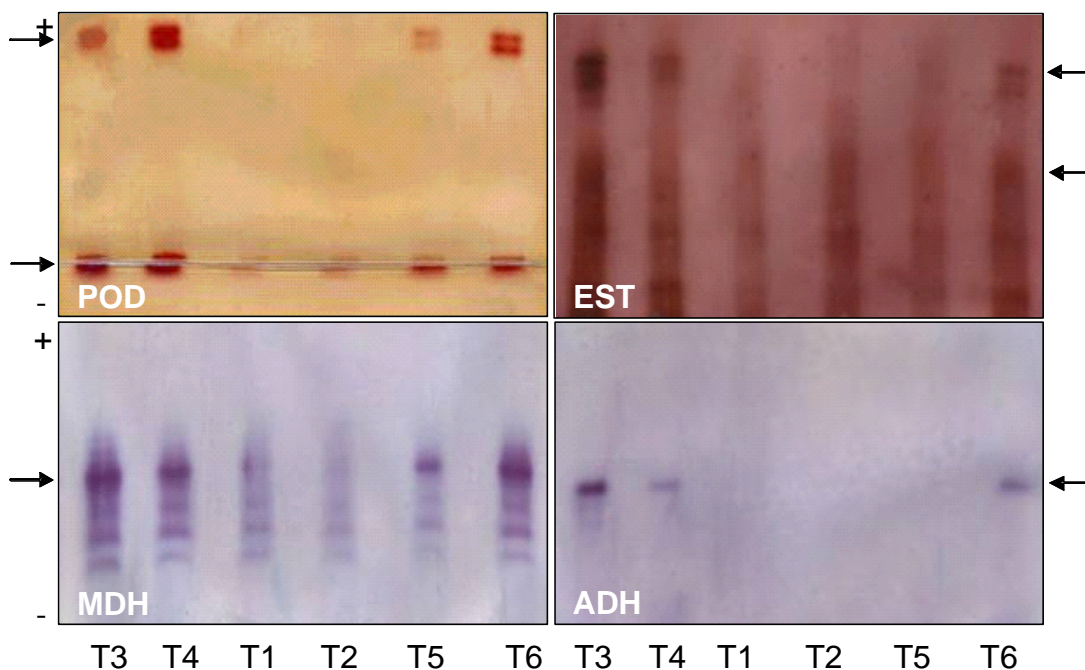


Figura 4. Análise isoenzimática pelo sistema peroxidase, esterase, malato desidrogenase e álcool desidrogenase de folhas de videira em diferentes concentrações de BAP em meio semi-sólido com Ágar ou Phytigel[®]. Nas setas, as principais diferenças na formação de bandas entre os tratamentos.

3.4 Análise de clorofila

Na Figura 5, são apresentados os teores de clorofila *a*, *b* e total em folhas de videiras normais e hiperídricas. A hiperidricidade afetou significativamente os níveis de clorofila, sendo que, em brotos hiperídricos, os níveis de clorofila *a*, *b* e totais foram, respectivamente, em torno de 26, 36 e 29% dos níveis em plantas aparentemente normais.

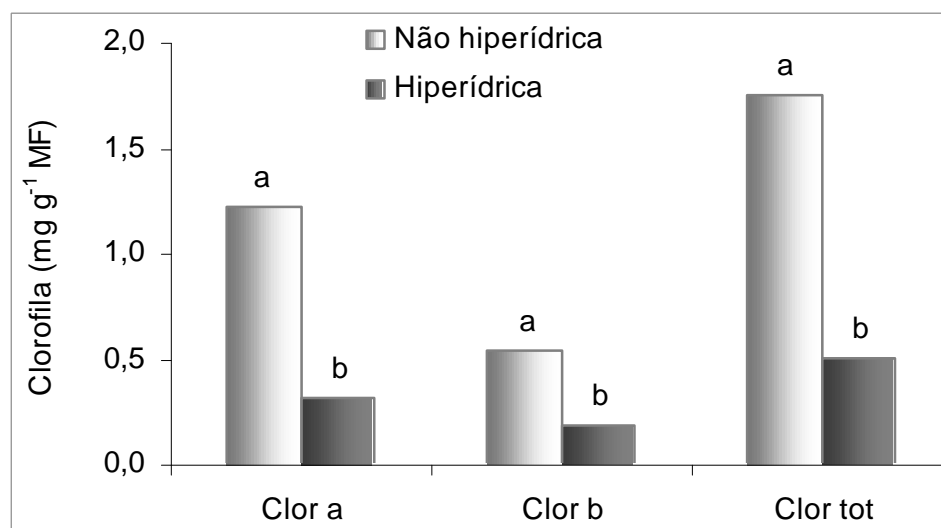


Figura 5. Conteúdo de clorofila em plantas hiperídricas e não hiperídricas de videira após 43 dias de cultivo. Média \pm desvio padrão. Barras com letras diferentes, para cada porção de clorofila, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a5% de probabilidade.

3.5 Análises de etileno

Plantas de videira apresentaram biossíntese máxima de etileno no 7^o dia de cultivo, em meio indutor de hiperidricidade. A partir desse momento, o acúmulo foi diminuindo e no 40^o dia de cultivo, apresentava taxas mínimas (Figura 6). Em meio sem BAP, o pico de produção de etileno ocorreu no 3^o dia de cultivo e, a partir do 14^o dia de cultivo, foi decrescendo ao longo do tempo de cultivo (Figura 6).

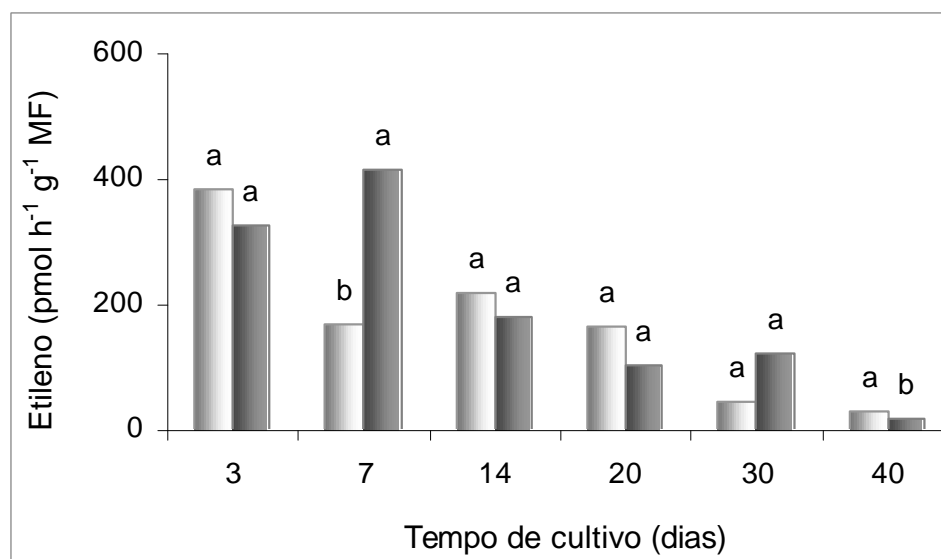


Figura 6. Produção de etileno nos frascos de cultivo com meio indutor (MS 0) e não indutor (MS + BAP) de hiperidricidade ao longo do desenvolvimento de videira. Barras com letras diferentes, para cada dia de análise, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

A análise de variância para o efeito de BAP nos dois meios de cultivo testados mostrou diferenças significativas quanto à percentagem de hiperidricidade, número de folhas e de brotações, altura e massa fresca da parte aérea, tamanho de raiz e diâmetro de calo.

A percentagem de hiperidricidade, a massa fresca, o número de folhas e o número de brotações aumentaram na presença de 2 mg L⁻¹ de BAP e Phytigel[®], para os dois meios. Por outro lado, a altura das brotações diminuiu, nestas condições. Os brotos com maior nível de BAP foram também os que apresentaram maior número de brotações. Porém, devido ao alto nível de hiperidricidade, não havia alongamento dessas brotações. Por esse motivo, sua altura foi inferior a de brotos sem características de hiperidricidade. A multiplicação de brotos é uma característica associada ao BAP, o qual é muito utilizado em sistemas de micropropagação por induzir a formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação (Dzazio et

al., 2002). Porém, esse agente de crescimento, quando utilizado em altas concentrações, tem sido relacionado ao processo de hiperidricidade (Qi-Guang et al., 1986; Jain et al, 2001). Esta citocinina também levou à inibição da formação de raízes e ao aumento da calogênese. Resultados semelhantes foram encontrados em culturas de *Castanea mollissima* (Qi-Guang et al., 1986) e *Pyrus pyrifolia* N. (Kadota et al., 2001) tratadas com altas concentrações de BAP.

Em *Prunus avium*, a substituição de Ágar por Phytigel[®] induz a hiperidricidade (Fanck et al., 1997). Da mesma forma, no porta-enxerto 'VR 043-43' de videira, a substituição de Ágar por Phytigel[®] leva a um incremento na hiperidricidade, porém, esse incremento só ocorre em presença de BAP no meio. Assim como foi observado no capítulo anterior, em morango, o Phytigel[®] também parece ter exercido um efeito potencializador do uso do BAP pelas plantas de videira, pois estas, quando cultivadas em Phytigel[®], exibiam níveis mais extremos de hiperidricidade, apresentando caules mais suculentos e quebradiços e folhas menos desenvolvidas que as mantidas em Ágar.

As folhas hiperídricas de videira têm aspecto suculento, devido ao aparente aumento do tamanho das células do mesofilo e dos espaços intercelulares. Células epidérmicas de plantas hiperídricas possuem formato irregular, formando alças que alojam os estômatos. Resultados semelhantes foram descritos para cravo (Olmos e Hellin, 1998) e berinjela (Picoli et al., 2001) hiperídricos.

Uma comparação entre folhas hiperídricas e normais mostra que as folhas hiperídricas possuem um parênquima lacunoso desorganizado, com grandes espaços intercelulares, com reduzido número de células e elevada área celular, sugerindo que o engrossamento da folha seja devido ao aumento do tamanho das células do mesofilo. Assim como em cravo, folhas hiperídricas de videira, apresentam células epidérmicas duas vezes maiores que as de folhas normais. As folhas hiperídricas foram caracterizadas pela dificuldade de delimitação entre o parênquima paliçádico e o esponjoso. Ao contrário, folhas normais possuem parênquima paliçádico bem definido, formado por uma única camada de células, que ocupa aproximadamente metade da espessura do mesofilo, e parênquima esponjoso com duas ou

três camadas largas de células com poucos espaços intercelulares. Estes resultados concordam com estudos prévios, que têm relatado folhas hiperídricas com mesofilo anormal, sistema vascular desorganizado e uma cutícula fina ou descontínua (Picoli et al., 2001; Olmos e Hellin, 1998). Folhas hiperídricas de maçã têm reduzido número de células da camada paliçádica, largos espaços intercelulares no mesofilo, tecido epidérmico defeituoso e fina cutícula (Pâques e Boxus, 1987).

A hiperidricidade envolve múltiplos fatores que são expressos em vários graus de anormalidade morfogênica, dependendo da resposta fisiológica específica às condições de cultura e à espécie estudada. Estômatos do porta-enxerto de videira 'VR 043 – 43, cultivado *in vitro*, estão localizados acima da linha das demais células da epiderme, provavelmente devido às condições de alta umidade relativa do cultivo, sendo essa uma característica de plantas hidrófitas. Esses apresentam células-guarda maiores e mais arredondadas que em estômatos normais. Resultados semelhantes foram relatados por Fontes et al. (1999) e Olmos e Hellin (1998) em pimentão e cravo, respectivamente. Segundo esses autores, esta modificação no tamanho e forma da célula-guarda se deve à turgescência adquirida pela grande absorção de água e à diminuição da elasticidade ou modificação no padrão de deposição de microfibrilas de celulose nestas células, que dificultam o fechamento do estômato.

De acordo com Martinez y Huaman (1995), os radicais livres são moléculas que contêm um elétron não pareado. Dessa forma, eles subtraem um elétron de uma molécula próxima, levando à formação de outro radical livre, provocando uma reação em cadeia que os torna altamente reativos. Em condições normais, a célula mantém um equilíbrio redox caracterizado pelo balanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o seu consumo por sistemas enzimáticos e não-enzimáticos. No entanto, quando o metabolismo é alterado por algum estresse (dano físico, envelhecimento, ataque de patógenos, hiperidricidade, entre outros), ocorre a produção de grande quantidade de radicais livres, que vão reagir com ácidos graxos insaturados, causando sua peroxidação.

Para proteger suas células dos efeitos tóxicos desses radicais livres, as plantas possuem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos,

conhecidas como antioxidantes. Entre as enzimas antioxidantes, estão a dismutase do superóxido, a peroxidase e a catalase (Taiz e Zeiger, 2004). A relação entre sistemas enzimáticos antioxidantes e desenvolvimento de hiperidricidade tem sido claramente observada em tecidos micropropagados (Franck et al., 1995; Olmos et al., 1997; Piqueras et al., 1998; Saher et al., 2004).

No presente trabalho, as atividades de peroxidase, catalase e dismutase do superóxido aumentaram com o aumento do BAP no meio e foram consideravelmente mais elevadas na maior concentração de BAP, em presença de Phytigel[®] como agente gelificante, condição na qual as plantas exibiam níveis máximos de hiperidricidade, em relação ao meio sem BAP, onde as plantas eram aparentemente normais.

O aumento da atividade dessas enzimas em tecidos hiperídricos sugere um mecanismo de defesa contra o aumento da produção de radicais superóxido, gerados pela situação de estresse. Neste caso, a SOD catalisa a reação de Haber-Weiss ($H_2O_2 + O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + \cdot OH + O_2$), onde estes radicais superóxido são convertidos em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. As atividades elevadas da peroxidase e da catalase indicam que os dois sistemas estariam sendo utilizados pela planta para eliminação do peróxido de hidrogênio liberado. Estes resultados concordam com os encontrados para tecidos de *Fragaria ananassa* sob estresse (Meira, 2004) e tecidos hiperídricos de *Dianthus caryophyllus* (Olmos et al., 1997) e de *Nicotiana tabacum* (Piqueras et al., 1998), mas diferem dos encontrados por Franck et al. (1995) em *Prunus avium*, onde a atividade de catalase diminuiu em tecidos hiperídricos.

O aumento da atividade de peroxidases na presença de BAP pode indicar uma intensa produção dos principais substratos dessa enzima (H_2O_2 , compostos fenólicos e/ou hidroperóxidos) que, provavelmente, contribuíram para o aumento da peroxidação dos lipídios nos tecidos hiperídricos (Peixoto, 1998).

O dano oxidativo, provocado pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio nos tecidos hiperídricos, foi comprovado pela maior intensidade de bandas dos sistemas isoenzimáticos POD, MDH, ADH e EST nestes tecidos, quando comparados aos tecidos não hiperídricos.

O aumento da intensidade das bandas da enzima malato desidrogenase pode estar ligado ao aumento da respiração, que ocorre em plantas em condições de estresse, já que esta enzima catalisa a reação do malato a oxaloacetato no ciclo de Krebs (Taiz e Zeiger, 2004).

A enzima álcool desidrogenase (ADH) atua no metabolismo anaeróbico de plantas, catalisando a conversão do acetaldeído a etanol (Pertel, 2001). A maior atividade dessa enzima, verificada em plantas hiperídricas, pode ser resultado de anaerobiose, com produção de etanol.

Da mesma forma, o sistema esterase (EST) mostrou maior atividade em plantas hiperídricas. Este sistema enzimático está envolvido em reações de hidrólise de ésteres e desempenha função-chave no metabolismo de lipídeos. (Pertel, 2001).

O acúmulo de MDA é um forte indicador de danos na membrana sob condições de estresse oxidativo. O aumento do nível de peroxidação de lipídios em videira hiperídrica sugere o aumento da produção de radicais hidroxila livres, gerados pela reação de Haber-Weiss, devido ao acúmulo de H_2O_2 .

Neste estudo foram observados baixos níveis de clorofilas *a*, *b* e totais em plantas hiperídricas, quando comparados com plantas sem característica de hiperidricidade. Resultados semelhantes foram encontrados em *Prunus avium* cultivados em meio indutor de hiperidricidade (Franck et al., 1997).

A degradação de clorofila pode ocorrer por ação de clorofilases, lipoxigenases e/ou peroxidases. Isoenzimas de peroxidases são encontradas no interior dos cloroplastos e, na presença de peróxido de hidrogênio e de compostos fenólicos, catalisam a reação de degradação de clorofila. É possível que o etileno, que tem efeito de aumentar a produção de hidroperóxidos, também esteja relacionado com a degradação de clorofila pelo aumento da atividade da peroxidase.

O acúmulo de etileno foi máximo nos primeiros dias de cultivo, decrescendo ao longo do desenvolvimento dos brotos. No meio indutor de hiperidricidade, o nível de etileno acumulado se manteve estável por um período mais longo, embora o acúmulo de etileno em ambiente não indutor

de hiperidricidade tenha sido mais elevado nos primeiros dias que em ambiente indutor de hiperidricidade.

De acordo com Kevers et al. (1984), a hiperidricidade é uma resposta morfofisiológica a condições de estresse, como excesso de água, NH_4^+ ou BAP. Este estresse parece mediar uma rápida produção endógena de etileno que é retroinibida pelo próprio etileno, subsequentemente, pela inibição da ACC sintase. A produção precoce do etileno pode ser resultado do aumento nas peroxidases básicas ligadas às membranas, que são geradas pela situação de estresse e, direta ou indiretamente, participam da conversão de ACC a etileno. Estas peroxidases também funcionam como IAA-oxidases, que podem ser ativadas no último passo da biossíntese do etileno. Dessa forma, a redução do conteúdo de IAA contribui para o decréscimo da produção de etileno através do controle da conversão do SAM a ACC, mediado pela IAA. Brotos de *Dianthus caryophyllus* cultivados em ambiente que favorecia o desenvolvimento de hiperidricidade acumularam mais etileno que os cultivados em ambiente não indutor de hiperidricidade (Kevers et al., 1984).

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que:

- O aumento da concentração de citocinina levou ao desenvolvimento de hiperidricidade em brotos de videira;
- A substituição de Ágar por Phytigel[®] induz maior formação de brotos hiperídricos;
- A adição de 2 mg L^{-1} de BAP no meio de cultivo induz ao estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes e pela peroxidação de lipídios, diminuição de clorofilas, alterações em nível celular, como malformações de estômatos e desorganização do mesofilo, além de manutenção, por maior período de tempo, de altos níveis de produção e acúmulo de etileno no interior dos frascos de cultivo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arimura, C. T. **Propagação in vitro de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) por meio de segmentos nodais estiolados**. Viçosa: UFV, 1997. 62p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.

Biasi, L. A.; Passos, I. R. S.; Pommer, C. V. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de videira através de ápices meristemáticos e segmentos nodais. **Scientia Agricola**, 55(2): 196-202, 1998.

Borghezan, M.; Moraes, L. K. A; Moreira, F. M.; Silva, A. L. Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38(7): 783-789, 2003.

Borsoi Filho, J. L. **Variabilidade isozimática e divergência genética em seis cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Viçosa: UFV, 1995. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.

Bozzola, J. J.; Russel, L. D. **Electron microscopy**. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1992. 542p.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 167: 290-294, 1976.

Buege, J.A., Aust, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, 52: 302-310, 1978.

Chance, B., Maehley, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, 2: 764-775, 1955.

Conkle, M. T., Hodgskiss, P. D., Nunnally, L. B. **Starch gel eletroforesis conifer seeds: a laboratory manual**. Berkerley, USDA: Forest Service, 1982. 18p.

Del Longo, O.T., González, C.A., Pastori, G.M., Trippi, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, 34(7): 1023-1028, 1993.

Dhindsa, R. S.; Plumb-Dhindsa, P.; Thorpe, T. A. Leaf senescence: carrelated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. **Journal of Experimental Botany**, 32: 93-101. 1981.

Dzazio, P. M.; Biasi, L. A.; Zanette, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420 – A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 24(3): 759-764, 2002.

Fontes, M. A.; Otoni, W. C.; Carolino, S. M. B.; Brommonschenkel, S. H.; Fontes, E. P. B.; Fári, M.; Louro, R. P. Hyperhydricity in pepper plants regenerated in vitro: involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. **Plant Cell Reports**, 19: 81-87, 1999.

Franck, T.; Crévecoeur, M.; Wuest, J.; Greppin, H.; Gaspar, T. Cytological comparison of leaves and stems of *Prunus avium* L. shoots cultured on a solid medium with Ágar or gelrite. **Biotechniques and Histochemistry**, 73: 32-43, 1997.

Franck, T.; Gaspar, T.; Kevers, C.; Penel, C.; Dommes, J.; Hausman, J.F. Are hyperhydric shoots of *Prunus avium* L. energy deficient? **Plant Science**, 160: 1145-1151, 2001.

Franck, T.; Kevers, C.; Gaspar, T. Protective enzymatic system against activated oxygen species compared in normal and vitrified shoots of *Prunus avium* L. raised in vitro. **Plant Growth Regulation**, 16: 253-256, 1995.

Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59(2): 309-314, 1977.

Havir, E. A., McHale, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 84(2): 450-455, 1987.

Hendry, G. A. F.; Price, A. H. Methods of comparative study anatomy: stress indicators – chlorophylls and carotenoids. In: Hendry, G. A. F.; Grime, K. P. **Methods in comparative plant ecology**, London: Chapman e Hall, p.148-152, 1993.

Jain, A.; Kantia, A.; Kothari, S.L. De novo differentiation of shoot buds from leaf-callus of *Dianthus caryophyllus* L. and control of hyperhydricity. **Scientia Horticulturae**, 87: 319-326, 2001.

Kadota, M.; Imizu, K.; Hirano, T. Double-phase in vitro culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, 89: 207-213, 2001.

Karnovsky, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27: 137-138, 1965.

Kevers, C.; Coumans, M.; Coumans-Gilles, M.F.; Gaspar, T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, 61: 69-74, 1984.

Martinez y Huaman, C. A. **Efeitos dos estresses hídrico, luminoso e oxidativo em diferentes espécies de batata (*Solanum* spp.)**. Viçosa: UFV, 1995. 122 p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.

Meira, L.S. **Atividade de enzimas do estresse oxidativo em morangueiro micropropagado e inoculado com fungos micorrízicos arbusculares durante a aclimatização**. Viçosa: UFV, 2004, 43 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 2004.

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

Olmos, E.; Piqueras, A.; Martinez-Solano Jr.; Hellin, E. The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydrated leaves of regenerated carnation plants. **Plant Science** 130: 97-105, 1997.

Olmos, E.; Hellín, E. Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation shoots. **Scientia Horticulturae**, 75: 91-101, 1998.

Pâques, M.; Boxus, Ph. A model to learn 'vitrification', the rootstock apple M.26 — present results, **Acta Horticulturae**. 212: 193-210, 1987.

Peixoto, P. H. P. **Peroxidação de lipídios em membranas e tecidos de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) com tolerância diferencial ao alumínio**. Viçosa: UFV, 1997. 112 p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.

Pertel, J. **Efeito do condicionamento fisiológico na germinação, no vigor e nas alterações enzimáticas em sementes de café (*Coffea arabica* L.)**. Viçosa: UFV, 2001. 101p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.

Picoli, E. A. T.; Otoni, W. C.; Figueira, M. L., Carolino, S. M. B.; Almeida, R. S.; Silva, E. A. M.; Carvalho, C. R.; Fontes, E. P. B. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). **Plant Science**, 160: 857-868, 2001.

Piqueras, A.; Cortina, M.; Serna, M. D.; Casas, J. L. Polyamines and hyperhydricity in micropropagated carnation shoots. **Plant Science**, 162: 671-678, 2002.

Piqueras, A.; Han, B. H.; Van Huylenbroeck, J. M.; Debergh, P. C. Effect of different environmental conditions *in vitro* sucrose metabolism and antioxidant enzymatic activities in cultured shoots of *Nicotiana tabacum* L. **Plant Growth Regulation**, 25: 5-10, 1998.

Qi-Guang, Y.; Read, P. E.; Fellman, C. D.; Hosier, M. A. Effect of cytokinin, IBA, and rooting regime on Chinese chestnut cultured *in vitro*. **HortScience**, 21: 133-134, 1986.

Quoirin, M.; Lepoivre, Ph. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, 78: 437-442, 1977.

Saher, S.; Piqueras, A.; Hellin, E.; Olmos, E. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, 120: 152-161, 2004.

Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2004. 719p.

Totola, M. R. **Cinética da fluorescência e atividade do sistema antioxidativo em plantas de eucalipto com micorrizas sob temperatura supra-ótima**. Viçosa: UFV, 1999. 86p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.

CAPÍTULO III

Influência do tipo de vedação do frasco de cultivo no desenvolvimento de hiperidricidade em plantas de videira e morangueiro cultivadas *in vitro*.

RESUMO

O presente trabalho estudou o efeito do tipo de fechamento dos frascos de cultivo nas trocas gasosas com o ambiente externo e no desenvolvimento de hiperidricidade em plantas de morangueiro cv. 'Dover' e videira 'VR 043-43' *in vitro*. Foram utilizadas plantas mantidas *in vitro* em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 h e irradiância $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em. As plantas foram transferidas para frascos contendo meio indutor (adicionado de 2 mg L^{-1} BAP) e não indutor (MS na ausência de reguladores de crescimento) de hiperidricidade. Os frascos foram vedados com tampa rígida de poliestireno; a mesma tampa, com membrana permeável a trocas gasosas; ou duas camadas de PVC. Foram mensurados os níveis de etileno aos 7, 20 e 40 dias de cultivo e, após 40 dias, foram analisados massa fresca e massa seca dos brotos, peroxidação de lipídios, sistemas enzimáticos MDH, ADH e POD, extravasamento de solutos, citometria de fluxo e características ultra-estruturais (varredura). A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que: a) o tipo de vedação utilizado influenciou o ambiente interno dos frascos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de hiperidricidade; b) nos frascos vedados com membrana permeável, mesmo em meio indutor de hiperidricidade, não foram observadas características morfológicas dessa anormalidade, embora tenha sido observado aumento da atividade de peroxidases e de extravasamento de eletrólitos em plantas de videira, submetidas a este tratamento; c) a vedação de frascos com PVC promoveu maior índice de hiperidricidade, mostrando que este pode estar intimamente influenciando o surgimento desse fenômeno em plantas cultivadas em nosso laboratório.

CHAPTER III

Influence from the sealing type of the culture flask upon the hyperhydricity development in grapevine and strawberry plants cultured *in vitro*.

SUMMARY

This study was carried out to determine the effect from the sealing type of the culture flasks on the gaseous changes with the external environment as well as on the hyperhydricity development in *in vitro* strawberry 'Dover' and grapevine 'VR 043-43' plants. Plants maintained *in vitro* in growth room at 25 ± 2 °C, under 16-hour photoperiod and irradiance $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were used. The plants were transferred to flasks containing either inductive (added 2 mg L^{-1} BAP) and non-inductive (MS at absence of growth regulators) for hyperhydricity. The flasks were sealed with rigid polystyrene cover; the same cover, but with membrane permeable to gaseous changes; or two PVC layers. The ethylene levels were measured at 7, 20 and 40 days under culture; after 40 days, the following were analyzed: fresh matter and dry matter of the shoots; lipid peroxidation; enzymatic systems MDH, ADH and POD; electrolyte leakage, flow cytometry; and ultrastructural characteristics (scanning). According to the obtained results, the following conclusions were drawn: a) the used sealing type affected the internal environment of the flasks, therefore the hyperhydricity development as well; b) in the flasks sealed with permeable membrane, even in the hyperhydricity-inducing medium, no morphologic characteristics for this abnormality were observed, although increased activity in either peroxidases and electrolyte leakage were observed in the grapevine plants submitted to this treatment; and (c) the sealing of the flasks with PVC promoted higher hyperhydricity index, thus showing that this one might be intimately influencing the appearance of this phenomenon in plants cultured in our laboratory.

1 INTRODUÇÃO

A propagação *in vitro* é uma ferramenta bastante útil para a obtenção de plantas geneticamente idênticas, livres de patógenos, com alta produtividade, características fisiológicas e anatômicas semelhantes às da planta de origem e que podem ser aclimatizadas em curto período de tempo, com baixo custo (Aitken-Christie et al., 1995). No entanto, diversos são os fatores que influenciam nas respostas morfogênicas, entre eles, o microambiente gerado no interior dos frascos de cultivo, caracterizado por elevada umidade relativa, baixa luminosidade, altas concentrações de açúcar, sais e reguladores de crescimento, além de baixas trocas gasosas, que podem conduzir ao surgimento de desordens que dificultam o desenvolvimento das culturas (Cassels e Curry, 2001; Aitken-Christie et al., 1995; Saher et al., 2004).

Microambientes dos frascos que não permitam trocas gasosas com o ambiente externo levam ao acúmulo excessivo de CO₂, etileno e vapor d'água. Essas condições podem estar associadas a aspectos indesejáveis na cultura de tecidos, como a hiperidricidade (Toledo et al., 1997, Dantas et al. 2001, Whitehouse et al. 2002). Essa anormalidade está intimamente ligada aos fatores de estresse na cultura de tecidos e é responsável por alterações anatômicas, bioquímicas e fisiológicas nas plantas. Embora sejam bem conhecidas as causas e características morfológicas da hiperidricidade, há muita dificuldade em seu controle e na compreensão das alterações que ocorrem em plantas acometidas por esse fenômeno. Park et al. (2004) citam o acúmulo excessivo de etileno, nos frascos de cultivo como o maior causador de hiperidricidade em brotos de batata. Porém, foram executados poucos trabalhos para elucidar o papel exato do etileno e de outros gases na ocorrência de hiperidricidade.

O microambiente no interior dos frascos de cultivo é delimitado do ambiente da sala de crescimento pela tampa utilizada para fechamento dos frascos. Entretanto, através de diferentes tipos de vedação, podem ocorrer trocas gasosas entre estes dois ambientes, permitindo que o ambiente interno seja influenciado pelo externo aos frascos.

O presente trabalho estudou o efeito do tipo de fechamento dos fracos de cultivo nas trocas gasosas com o ambiente externo e no desenvolvimento de hiperidricidade em plantas de morangueiro cv. 'Dover' e de videira 'VR 043-43' cultivadas *in vitro*. Para tanto, foram realizadas mensurações do teor de etileno acumulado e produzido, bem como avaliação dos fatores envolvidos na hiperidricidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados no experimento, segmentos nodais de plantas do porta-enxerto de videira 'VR043-43' (*Vitis vinifera* x *V. rotundifolia*), no 7º subcultivo, cedidas pelo Prof. Luiz Antônio Biasi, do Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal do Paraná. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ \text{C}$, sob fotoperíodo de 16 h e irradiância $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em tubos de ensaio contendo meio semi-sólido, com metade dos sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, complexo vitamínico de MS ($0,2 \text{ g L}^{-1}$ de glicina, $0,05 \text{ g L}^{-1}$ de ácido nicotínico, $0,05 \text{ g L}^{-1}$ de piridoxina.HCl e $0,01 \text{ g L}^{-1}$ de tiamina.HCl) e $6,5 \text{ g L}^{-1}$ de Ágar (Merck, Alemanha), e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

Também foram utilizadas plantas de morangueiro (*Fragaria x ananassa*) 'Dover' cedidas pelo Laboratório de cultura de tecidos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Clima Temperado – Pelotas/RS e mantidas *in vitro* em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ \text{C}$, sob fotoperíodo de 16 h e irradiância $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mediante subcultivos mensais em frascos contendo meio com sais e vitaminas de MS acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, $6,5 \text{ g L}^{-1}$ de Ágar (Merck, Germany) e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, sendo o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem.

2.1 Ocorrência de hiperidricidade nas brotações.

Para o experimento utilizando videira, segmentos de entrenós de aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo 1 gema axilar foram transferidas para frascos de vidro (360 mL de capacidade) (4 segmentos por frasco) contendo 40 mL de meio básico com as vitaminas e metade dos sais de MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 2,5 g L⁻¹ de Phytigel[®], com 0,0 ou 2,0 mg L⁻¹ de 6-benzil amino purina (BAP). Para o experimento com morangueiro, plantas individualizadas foram transferidas para frascos de vidro (240 mL de capacidade) (4 plantas por frasco) com 30 mL de meio MS, com as mesmas concentrações de sacarose, mio-inositol e Phytigel[®], acrescido de 0,0 ou 2,0 mg L⁻¹ de BAP. Todos os meios tiveram o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

Após inoculação, os frascos foram vedados com: tampa rígida de polipropileno autoclavável com 56 mm de diâmetro interno, 3 mm de espessura e 12 mm de altura (TR); a mesma tampa com filtro MilliSeal[®] AVS-045 Air Vent (Tóquio, Japão) de 0,22 µm (TP); ou duas camadas de filme de policloreto de vinila com 17 µm de espessura (PVC) (Figura 2A e B). Os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar (sob condições assépticas). As culturas foram mantidas sob irradiância de 35 µmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 h (duas lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20 W, Osran, Brasil) e temperatura de 25 ± 2° C.

Diariamente, foi realizado acompanhamento do desenvolvimento das brotações quanto à formação de raízes e desenvolvimento de hiperidricidade e, ao final de 40 dias de cultivo, foram realizadas as seguintes avaliações: massa fresca e massa seca da parte aérea, peroxidação de lipídeos, análise de isoenzimas, citometria de fluxo e extravasamento de eletrólitos, além de mensurações da concentração de etileno produzida no interior dos frascos de cultivo.

2.2 Determinação da concentração de etileno produzido no interior dos frascos

As mensurações dos níveis de etileno produzido no interior dos frascos de cultivo foram realizadas aos 7, 20 e 40 e aos 5, 20 e 35 dias de cultivo, para plantas de morangueiro e videira, respectivamente, no Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas, do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa. Para tal, as tampas dos frascos eram retiradas e estes permaneciam abertos, em câmara de fluxo laminar, por 30 minutos, quando eram novamente vedados e voltavam para as condições de câmara de crescimento. Após 24 horas, amostras de 1 mL do ambiente interno dos frascos foram retiradas, com auxílio de seringa e de septos de silicone adaptados em todos os tipos de vedação, e injetadas em equipamento de cromatografia gasosa Hewlett-Packard 5890, séries II, equipado com coluna de aço inoxidável empacotada com Poropak-Q (80 – 100 mesh), de 3,2 mm de diâmetro interno e 1,5 m de comprimento, tendo como fase móvel o nitrogênio, com fluxo de 30 mL s⁻¹. As temperaturas da coluna, do injetor e do detector eram mantidas em 60, 75 e 135 °C, respectivamente.

A concentração de etileno produzido foi expressa em pmol C₂H₄ h⁻¹ g⁻¹ massa fresca, levando em consideração o volume do frasco.

2.3 Análise da peroxidação de lipídeos

A peroxidação dos lipídios foi medida pela determinação da quantidade formada de malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação dos lipídios, utilizando-se o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por Buege e Aust (1978). Tecidos da parte aérea pesando 100 mg (MF) foram homogeneizados em 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) em almofariz de porcelana, na presença de polivinilpolipirrolidona (PVPP) na proporção de 1:1,5 (MF:PVPP). O homogenato foi centrifugado por 30 minutos a 4000 g. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4°C. Em seguida, alíquotas de 1 ml dos sobrenadantes foram adicionadas a 4 ml da mistura contendo 10% (p/v) de

TCA (ácido tricloroacético) e 0,5% (p/v) de TBA (ácido tiobarbitúrico), contendo 0,01% (p/v) de BHT (butilhidroxitolueno). Os tubos de ensaio foram fechados e incubados em banho-maria por 15 minutos a 95 °C, sob agitação. A reação foi interrompida pela transferência dos tubos de ensaio para banho de gelo. A absorvância dos sobrenadantes foi lida a 535 e 600 nm. A quantidade formada do complexo MDA-TBA foi determinada utilizando-se, para os cálculos, o coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Dhindsa et al., 1981).

2.4 Determinação do extravasamento de eletrólitos

Para determinação do extravasamento de eletrólitos, foram utilizados 100 mg de tecido foliar. As amostras passaram por período de repouso de 2 horas, no escuro, em tubos de ensaio contendo 15 mL de água destilada. Após o tempo de repouso, foi medida a condutividade elétrica da água e os tubos contendo as amostras foram autoclavados (121 °C a 1,5 kgf cm⁻²) por 30 minutos, eliminando, assim, a permeabilidade seletiva das membranas e permitindo o extravasamento total dos solutos celulares. Após autoclavagem, a condutividade elétrica da água foi medida novamente e os resultados foram expressos como a razão entre a primeira e a segunda medição, multiplicada por 100.

2.5 Citometria de fluxo

Discos foliares, com 6 mm de diâmetro, foram retirados de folhas totalmente expandidas e colocados em placa de Petri, devidamente identificada, contendo 1 ml de solução tampão utilizada na extração de núcleos (ácido cítrico 0,1M e Tween 20 a 5%). As amostras foram picotadas com uma lâmina de barbear e filtradas em telas de 30 µm de mesh para um Eppendorf. A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido, utilizando Vortex, em 100 µl do mesmo tampão utilizado na extração dos núcleos e estocado por 10 minutos a 5° C no escuro.

As amostras foram submetidas à coloração com DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol, Sigma Chem. Co, US) e IP (Iodeto de Propídio, Sigma Chem. Co, USA). Na coloração com DAPI utilizou-se 1,5 ml de solução contendo: 500 µl de DAPI 15µM e Na₂HPO₄.2H₂O 0,4M. O material foi incubado à temperatura ambiente, no escuro, por 10-15 minutos. Na coloração com IP utilizou-se 1,5 ml de solução contendo: 500 µl de iodeto de propídio 15 mM, 500 µl de RNase 1mg ml⁻¹ e Na₂HPO₄.2H₂O 0,4 M. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. Após coloração as amostras foram transferidas para tubos de leitura de um citômetro de fluxo Partec PAS II/III (PARTEC GmbH, Munster, Germany), equipado com fontes de laser e lâmpada de mercúrio de alta pressão (HBO) – 100 W e filtros de excitação KG-1, BG-38 e UG-1; este último utilizado para excitação em UV de 200-700 nm. As posições dos picos GO/G1 e os coeficientes de variação (CV) foram calculados por meio do programa FlowMax Partec. Utilizou-se como padrão interno *Pisum sativum* L. (2C=9,09 pg de DNA) (Dole et al., 1992) e o conteúdo de DNA nuclear foi estimado segundo Dole et al. (1991). O padrão interno foi cedido pelo Dr. J. Dole et al. (Institute of Experimental Botany, Olomuc, Czech Republic). Foram analisados, no mínimo, 4.700 núcleos por amostra sendo, aquelas com coeficiente de variação (CV) maior que 3%, descartadas.

2.6 Análise de isoenzimas

Para análise isoenzimática, foram utilizadas amostras de folhas normais e hiperídricas previamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C. Para a extração, cerca de 100 mg de tecido/mL de solução-tampão foram macerados utilizando almofariz e pistilo, previamente congelados e mantidos sobre barras de gelo (Arimura, 1997).

Os sistemas isoenzimáticos foram caracterizados pela técnica de eletroforese horizontal em géis de amido de milho (Maizena[®]) a 12% (p/v) em solução tampão (Conkle et al., 1982).

No preparo do gel, foram empregados 350 mL de solução-tampão, dos quais 80 mL foram levados à fervura em fogo brando e, imediatamente após a fervura, vertidos no Erlenmeyer e retornados à chama, para o

cozimento do amido. Em seguida, o conteúdo do Erlenmeyer foi vertido em uma forma de acrílico (17,0 x 14,0 x 1,0 cm) sobre a qual se colocou uma placa de vidro pré-aquecida a 60 °C, com a finalidade de se uniformizar a superfície do gel. Os géis foram preparados à tarde e deixados à temperatura ambiente até a manhã do dia seguinte. Em seguida, foram resfriados a 4 °C por uma hora em câmara fria, antes da condução da eletroforese.

Para aplicação das amostras e corrida eletroforética, retirou-se a placa de vidro e, a cerca de 2,5 cm da extremidade, fez-se um corte perpendicular, afastando a menor porção do gel. O tecido vegetal triturado foi aplicado em uma tira de papel cromatográfico Whatman 3 MM (12 x 5 mm), com auxílio de uma pinça, para absorção do filtrado e as amostras absorvidas pelas tiras de papel foram colocadas ao longo da face cortada do gel maior, cobrindo completamente a espessura do gel. Aplicou-se a solução de azul de bromofenol em tira própria, para monitorar a migração. Em seguida, foi apoiado o suporte do gel sobre as cubas e conectado o gel às cubas dos eletrodos, para cada sistema enzimático.

Fez-se uma pré-corrída eletroforética durante 15 minutos a 150 volts, a fim de que as proteínas fossem liberadas das tiras de papel Whatman 3 MM para o gel. Desligou-se o aparelho, retirou-se o gel das cubas e, com auxílio de pinça cirúrgica, foram removidas as tiras. Conectou-se o gel às cubas e ligou-se o aparelho novamente a 200 volts, segundo metodologia utilizada por Arimura (1997).

Após a corrida eletroforética, o gel foi cortado em fatias, com auxílio de guias e mediante o uso de um fio de nylon. As fatias dos géis foram, então, colocadas sobre bandejas refratárias tipo Pyrex e, sobre elas, foram vertidas as soluções com os substratos específicos para cada sistema enzimático, conforme Borsoi Filho (1995).

Para o sistema peroxidase, as bandejas refratárias foram colocadas em câmara fria a 4 °C, até o aparecimento das bandas isoenzimáticas. Já para os sistemas isoenzimáticos esterase, glutamato oxaloacetato transaminase, malato desidrogenase e isocitrato desidrogenase, as bandejas refratárias foram colocadas em estufa à temperatura de 37 °C, no escuro, até o aparecimento das bandas isoenzimáticas. Em seguida, as

soluções reveladoras foram descartadas pela passagem de água corrente e os padrões nos géis foram fixados, durante 12 horas em câmara fria a 4 °C, com uma solução com 10% (p/v) de glicerina. Após este período, a solução de glicerina foi removida e substituída por uma solução com 65% (v/v) de álcool etílico, 30% de água e 5% de glicerina, durante 5 minutos, com o objetivo de se desidratarem os géis. Imediatamente após, os géis foram secados pelo método do bastidor e armazenados em papel-toalha.

2.7 Microscopia eletrônica de varredura

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura, foram empregadas lâminas foliares completamente expandidas do porta-enxerto 'VR 043 – 43' de videira, de acordo com Karnovsky (1965).

Amostras de folhas foram fixadas por imersão em glutaraldeído (Karnovsky, 1965 – 2,5% glutaraldeído, 4,5% de paraformaldeído a 4%, 3% de sacarose, CaCl₂ 5 µM em tampão cacodilato 0,1M pH 6,8). Em seguida, estas amostras foram desidratadas em série etílica, até álcool absoluto. Após, foram secas em ponto crítico com CO₂ líquido (Bozzolla e Russel, 1992), utilizando o equipamento Balzers (Modelo CPD 020), fixadas em "Stubs" e submetidas à deposição metálica com ouro, por pulverização catódica em equipamento Balzers de congelamento a seco, (Modelo FDU 010) acoplado ao conjunto de pulverização catódica (Modelo SCA 010). As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (Modelo 1430VP, LEO), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

2.8 Delineamento estatístico

Foram realizados dois experimentos independentes, um para cada espécie em estudo.

Os tratamentos foram dispostos num esquema fatorial (2 x 3) constituídos dos seguintes fatores: 2 meios de cultivo (indutor e não indutor de hiperidricidade) x 3 tipos de vedação (TR, TP e PVC).

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, no qual a unidade experimental consistiu em 1 frasco com quatro plantas, sendo testados 6 tratamentos com 5 repetições, para as análises aos 40 dias, para cada variedade. Para as análises do etileno, foram utilizados 6 tratamentos com 5 repetições e 3 períodos de avaliação. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

3.1 Tipos de vedação e ocorrência de hiperidricidade nas brotações

A influência do tipo de vedação no desenvolvimento dos brotos de morangueiro e videira está representada nas Tabelas 1 e 2.

Os primeiros sintomas de hiperidricidade surgiram aos 10 e 16 dias para morangueiro e videira, respectivamente, no tratamento com adição de BAP e sistema vedação TR. Estas plantas desenvolveram caules com entrenós mais curtos, folhas de aspecto vítreo, translúcidas e menos expandidas. Também apresentavam tamanho médio reduzido, quando comparadas a plantas normais (Figura 1).

Ao longo do desenvolvimento das plantas, ocorreu condensação de água nas paredes internas dos frascos vedados com TR e com PVC (Figura 1C), tanto em meio indutor como em não indutor de hiperidricidade. Nos frascos vedados com TP, não ocorreu essa condensação.

Nos frascos vedados com tampa permeável (TP), foram encontrados menores valores de massa fresca e massa seca em *F. ananassa*. Porém, a relação entre massa seca e massa fresca (Figura 2 e Tabela 1) foi maior nas plantas submetidas a esse tipo de vedação. Por outro lado, em videira sob esse tratamento, tanto a percentagem de massa seca quanto os valores de massa seca e massa fresca foram aumentados.

Tabela 1. Influência do tipo de vedação no desenvolvimento da parte aérea de morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch 'Dover'), após 30 dias de cultivo

Parâmetros avaliados	Meio de cultivo	Tipo de vedação		
		TR	TP	PVC
Massa fresca (g)	MS 0	2,16 ± 0,26	0,81 ± 0,36	2,18 ± 0,29
	MS + BAP	3,56 ± 0,44	1,30 ± 0,38	3,08 ± 0,62
Massa seca (g)	MS 0	0,25 ± 0,02	0,14 ± 0,07	0,27 ± 0,02
	MS + BAP	0,27 ± 0,11	0,18 ± 0,03	0,26 ± 0,02
Massa seca (%)	MS 0	11,58 ± 0,07	17,78 ± 2,74	12,40 ± 1,02
	MS + BAP	7,69 ± 0,96	14,37 ± 2,00	8,30 ± 2,34

± Desvio padrão da média.

(TR) tampa rígida de polipropileno;

(TP) tampa rígida de polipropileno com membrana;

(PVC) 2 camadas de filme de policloreto de vinila.

Tabela 2. Influência do tipo de vedação no desenvolvimento da parte aérea do porta-enxerto 'VR 043 – 43' de videira, após 20 dias de cultivo

Parâmetros avaliados	Meio de cultivo	Tipo de vedação		
		TR	TP	PVC
Massa fresca (g)	MS 0	0,24 ± 0,101	0,18 ± 0,059	0,23 ± 0,089
	MS + BAP	0,84 ± 0,149	0,63 ± 0,212	0,84 ± 0,185
Massa seca (g)	MS 0	0,01 ± 0,002	0,013 ± 0,003	0,011 ± 0,001
	MS + BAP	0,01 ± 0,001	0,017 ± 0,003	0,013 ± 0,003
Porcentagem de massa seca	MS 0	14,97 ± 2,423	17,27 ± 2,126	13,42 ± 1,983
	MS + BAP	10,38 ± 1,208	17,95 ± 2,269	12,33 ± 0,864

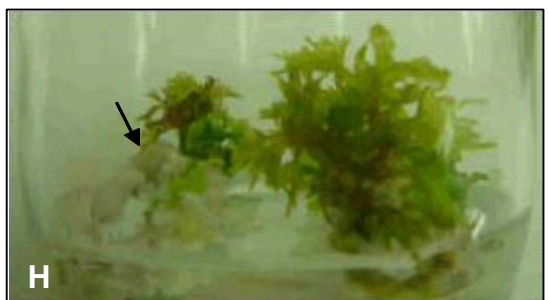
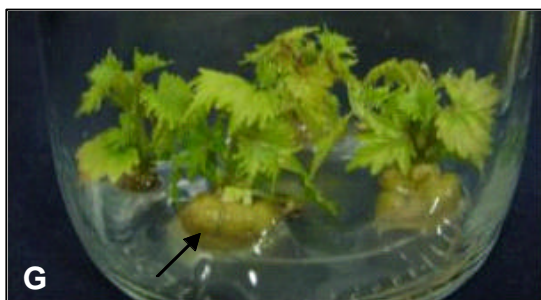
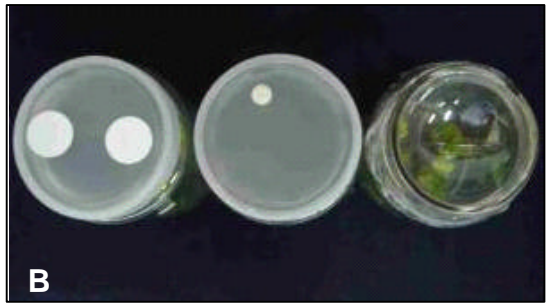
± Desvio padrão da média.

(TR) tampa rígida de polipropileno;

(TP) tampa rígida de polipropileno com membrana;

(PVC) 2 camadas de filme de policloreto de vinila.

Figura 1. (A) Detalhe do experimento conduzido *in vitro* para avaliação de diferentes tipos de vedação sobre a ocorrência de hiperidricidade em videira, aos 30 dias de cultivo; (B) Tipos de vedação, da esquerda para a direita: tampa rígida com membrana, tampa rígida e duas camadas de PVC; (C) Aspecto das brotações axilares de videira, cultivadas em presença de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP, em frascos vedados com tampa rígida de polipropileno com membrana, tampa rígida de poliestireno e duas camadas de filme do tipo policloreto de vinila (PVC), aos 30 dias de cultivo; a seta indica a formação de condensação de vapor d'água nas paredes dos frascos; notar a grande desidratação no frasco à esquerda, correspondente à tampa com membrana, bem como o aspecto vítreo das brotações desenvolvidas no frasco central e no da direita; (D) Detalhe do septo de silicone utilizado para a retirada de etileno do ambiente interno dos frascos; (E) Comparação entre brotações de videira submetidas a tratamento com PVC em meio não indutor (MS), à esquerda, e indutor de hiperidricidade ($\text{MS} + 2,0 \text{ L}^{-1}$ BAP), à direita – notar o comprometimento da expansão foliar, do alongamento dos brotos e calejamento friável na base dos ramos. (F) Planta de videira em meio não indutor de hiperidricidade aos 30 dias de cultivo – notar a expansão foliar; (G) Aspecto das brotações cultivadas sob vedação com tampa rígida e membrana permeável em meio indutor de hiperidricidade. Na seta, detalhe do calejamento com calos mais compactos. (H) Aspecto das brotações desenvolvidas em meio indutor de hiperidricidade e sob vedação com tampa rígida. Na seta, detalhe da formação de calos friáveis.



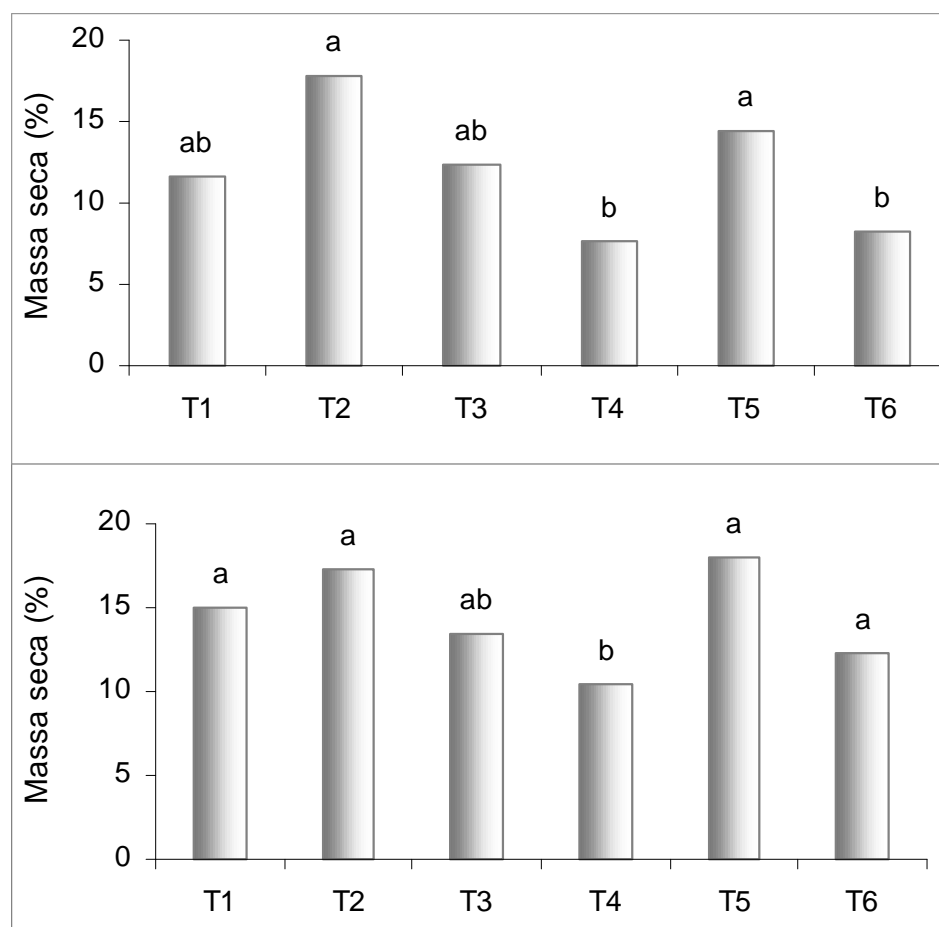


Figura 2. Percentagem de massa seca em morangueiro (A) e videira (B) aos 30 dias de cultivo. Meio MS0: T1 Tampa rígida (TR); T2 Tampa permeável (TP); T3 PVC. Meio MS + BAP: T4 TR; T5 TP; T6 PVC. Barras com a mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2 Determinação da concentração de etileno acumulado e produzido no interior dos frascos

A biossíntese de etileno em frascos com diferentes tipos de vedação, para cultivo de videira e morangueiro, é apresentada na Figura 3.

Plantas de morangueiro e videira apresentaram padrões distintos na produção de etileno. Em morango, diferenças significativas foram observadas no 20º dia de cultivo entre T5 e os demais tratamentos com

meio indutor de hiperidricidade. Porém, plantas de videira não apresentaram resultados semelhantes, sendo que não houve diferenças significativas na biossíntese do etileno entre os tratamentos em meio indutor de hiperidricidade. Em videira, foi observada produção de altos níveis de etileno nos tratamentos com PVC em meio indutor de hiperidricidade e no controle não indutor.

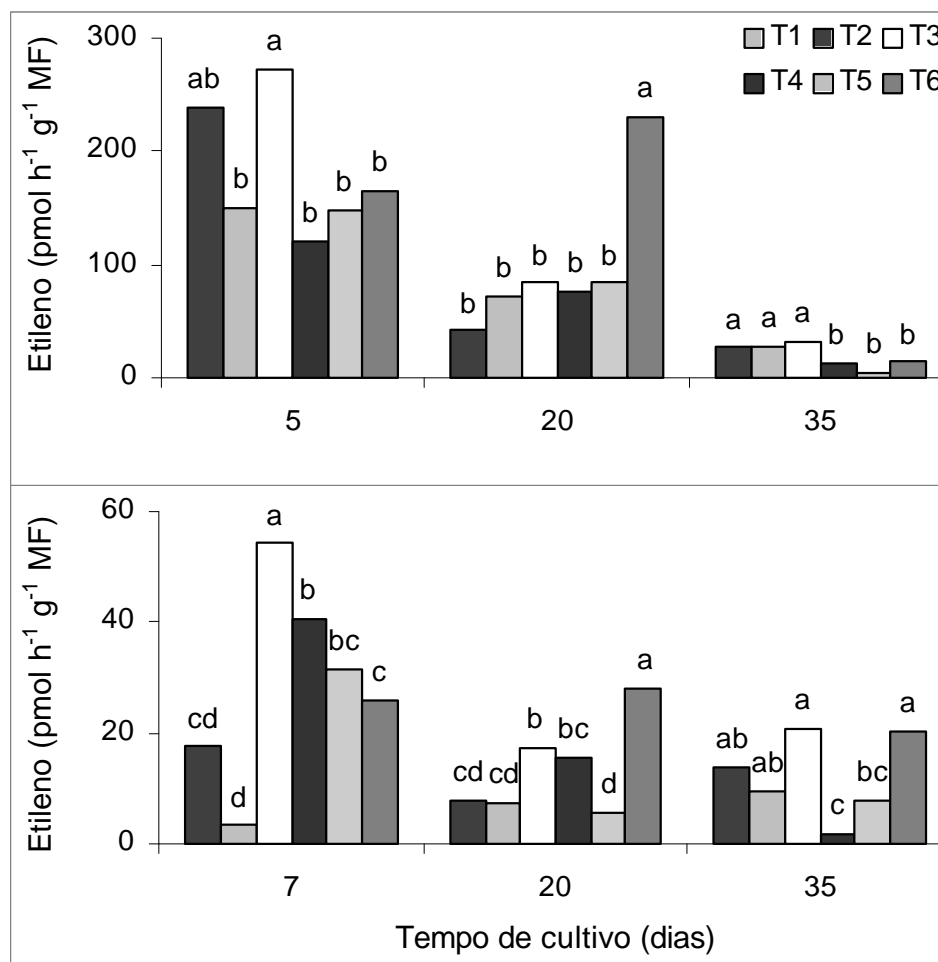


Figura 3. Biossíntese de etileno em videira (A) e morangueiro (B), em frascos com diferentes tipos de vedações. Meio MS0: T1 Tampa rígida (TR); T2 Tampa permeável (TP); T3 PVC. Meio MS + BAP: T4 TR; T5 TP; T6 PVC. Barras com letras iguais, para cada dia de análise, não diferem significativamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.3 Peroxidação de lipídios

A peroxidação de lipídios nos tecidos de videira e morangueiro, em frascos com diferentes tipos de vedações, pode ser observada na Figura 4. Em morangueiro, houve aumento significativo na formação do complexo MDA-TBA e, conseqüentemente, na peroxidação dos lipídios nos tratamentos T3 e T6. Em videira, o tratamento T3 apresentou maior acúmulo desse complexo, em relação aos tratamentos T5 e T6, não diferindo estatisticamente dos demais. Nos tratamentos T2 e T5, nos quais foram utilizadas membranas permeáveis, a formação de complexo MDA-TBA manteve-se inferior aos demais tratamentos.

3.4 Determinação do extravasamento de eletrólitos

Foi observado um aumento nas taxas de extravasamento de solutos em folhas hiperídricas, quando comparadas com folhas normais, indicando deterioração da membrana. Estes resultados podem ser observados na Figura 5. Os tratamentos T4 e T6, em videira e T4, em morangueiro, foram os que apresentaram maior extravasamento de solutos. T5 não diferiu significativamente dos demais tratamentos, em videira, onde apresentou alta percentagem de extravasamento. Em morangueiro, este tratamento apresentou níveis mais baixos de extravasamento, não diferindo dos tratamentos não indutores de hiperidricidade.

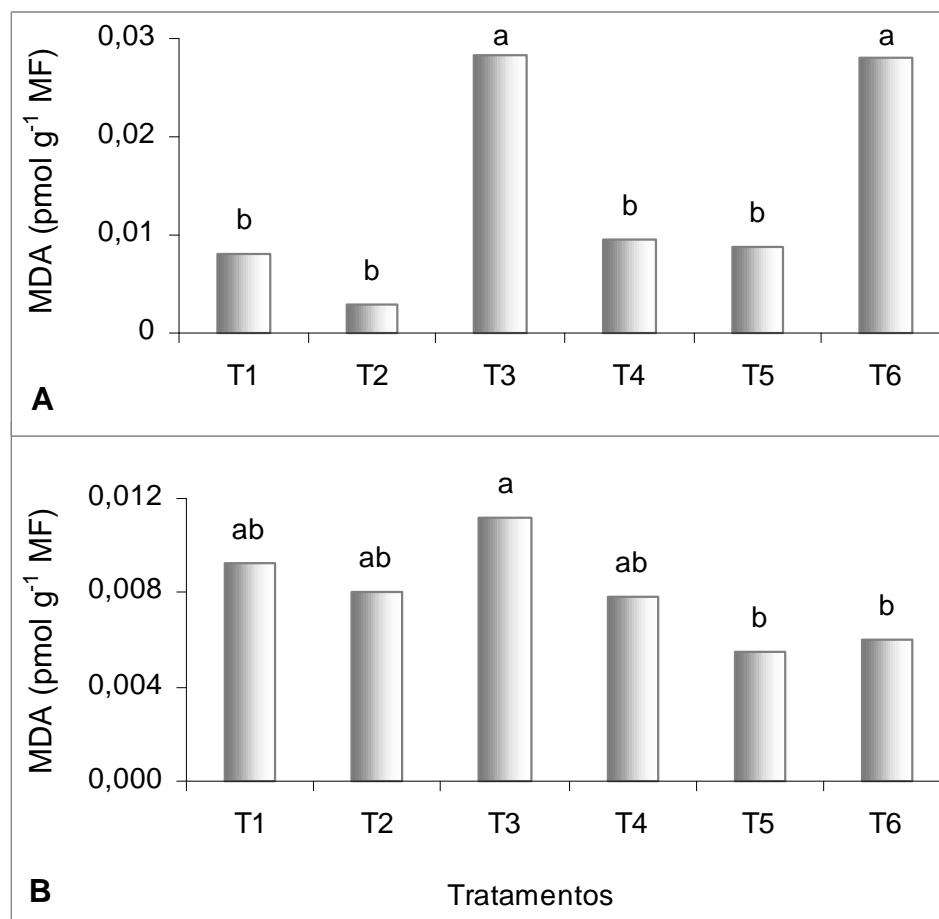


Figura 4. Efeito do tipo de vedação nos frascos de cultivo sobre a peroxidação dos lipídios em tecidos da parte aérea de videira (A) e morangueiro (B). Barras com a mesma letra, para cada espécie, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Meio MS0: T1 Tampa rígida; T2 Tampa permeável; T3 PVC. Meio MS + BAP: T4 Tampa rígida; T5 Tampa permeável; T6 PVC.

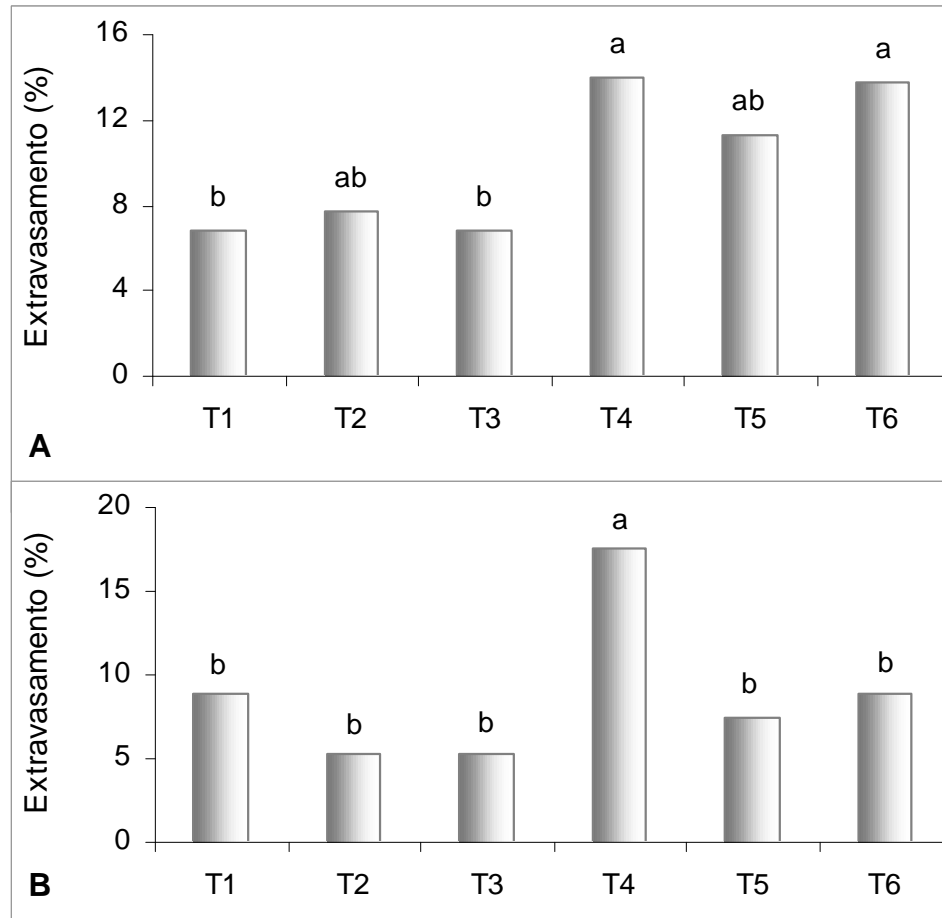


Figura 5. Efeito de tipo de vedação nos frascos de cultivo sobre o extravasamento de solutos em folhas de videira (A) e morangueiro (B). Barras com a mesma letra, para cada espécie, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Meio MS0: T1 Tampa rígida; T2 Tampa permeável; T3 PVC. Meio MS + BAP: T4 Tampa rígida; T5 Tampa permeável; T6 PVC.

3.5 Citometria de fluxo

Histogramas de excelente qualidade e bem definidos foram obtidos mediante o processamento das amostras no citômetro de fluxo para videira (Figura 6 A-F) e morangueiro (Figura 7 A-B). Os gráficos gerados apresentaram coeficientes de variação inferiores a 3%. Os números de núcleos analisados e a distribuição quantitativa e percentual dos mesmos nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S, G2/M) são mostrados na Tabela 3. Observa-se que os maiores percentuais de núcleos estão concentrados na fase G1 (86,4 a 94,4%), seguido de percentuais mais elevados na fase de transição G2/M, à exceção para T4 de videira e T1 de morangueiro, que apresentaram percentuais de 9,8% contra 3,3% e 7,2% contra 6,7% para a fase S e G2/M, respectivamente.

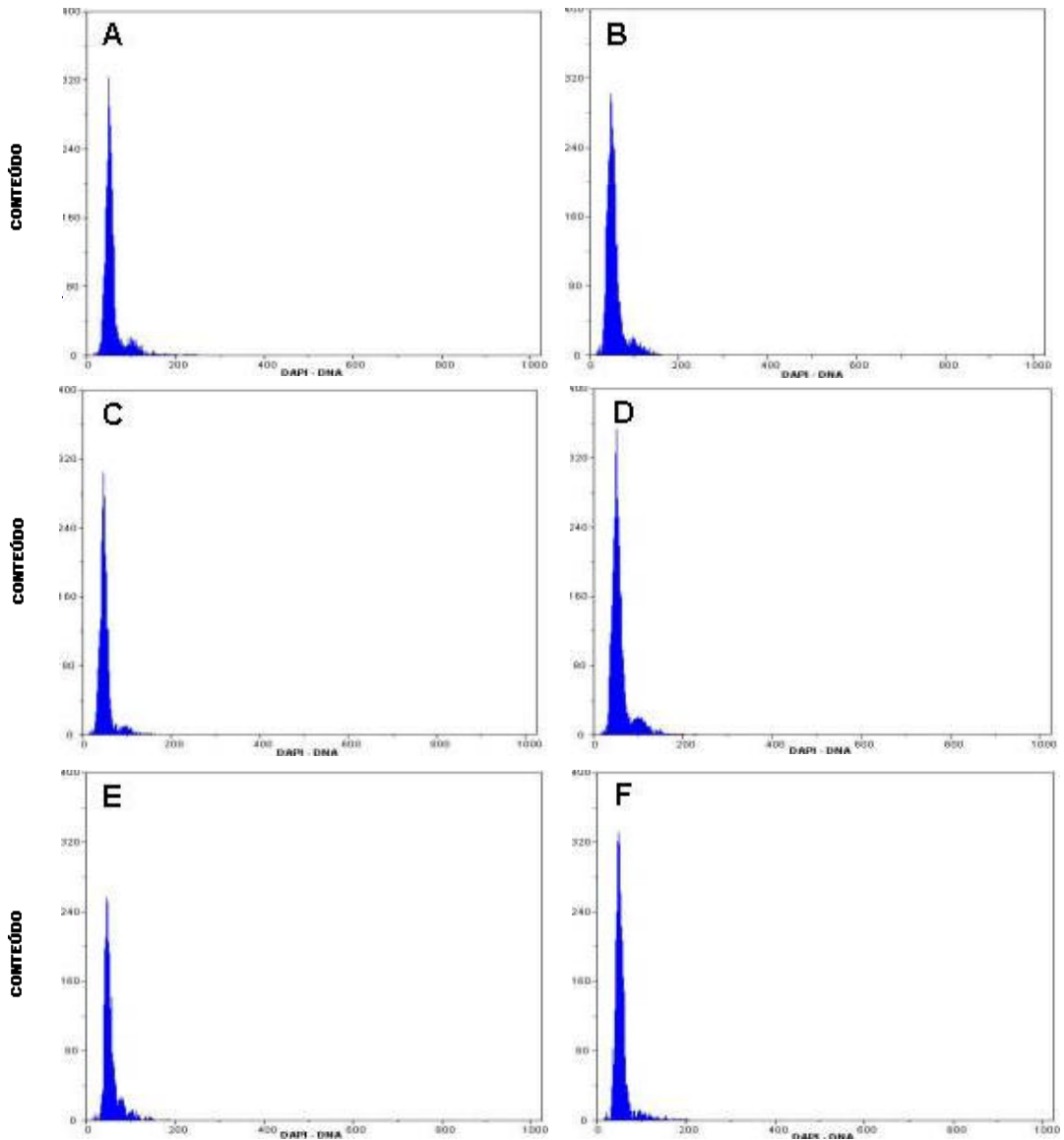


Figura 6. Histogramas das quantidades de DNA nuclear (pg) presentes nas brotações de videira. (A) brotações cultivadas em MS/2 vedado com tampa rígida;(B) brotações cultivadas em MS/2 vedado com tampa rígida e membrana permeável; (C) brotações cultivadas em MS/2 vedado com duas camadas de PVC; (D) brotações cultivadas em MS/2 e 2.0 mg L⁻¹ BAP vedado com tampa rígida; (E) brotações cultivadas em MS/2 e 2.0 mg L⁻¹ BAP vedado com tampa rígida + membrana permeável; (F) brotações cultivadas em MS/2 e 2.0 mg L⁻¹ BAP vedado com duas camadas de PVC.

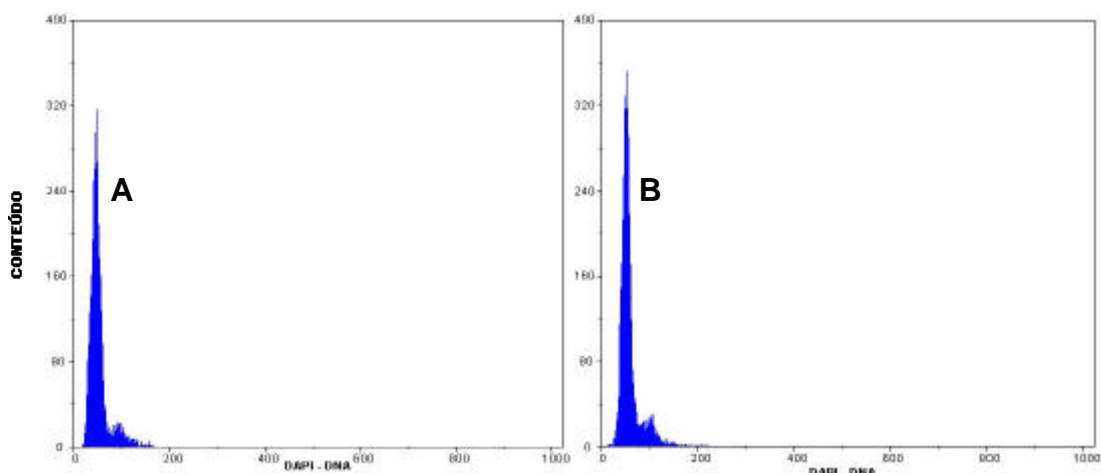


Figura 7. Histogramas das quantidades de DNA nuclear (pg) presentes em folhas de brotações de *Fragaria ananassa* cv. 'Dover' cultivadas em meio indutor e não indutor de hiperidricidade. (A) núcleos provenientes de brotações cultivadas em MS0 vedado com tampa rígida; (B) núcleos provenientes de brotações cultivadas em MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ BAP, vedado com tampa rígida.

Tabela 3. Número médio de núcleos analisados por citometria de fluxo e distribuição percentual de núcleos nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S, G2/M) de amostras foliares de videira (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* L. 'VR 043-43') e morangueiro 'Burkley', cultivadas *in vitro* sob diferentes tipos de vedação e meios indutor e não-indutor de hiperidricidade

Tratamentos	Número de núcleos analisados				Núcleos (%)			
	G1	S	G2/M	Total	G1	S	G2/M	Total
Videira*								
T1	6244	194	306	6744	92,6	2,9	4,5	100,0
T2	5272	211	398	5881	89,6	3,6	6,8	100,0
T3	4403	151	227	4781	92,1	3,2	4,7	100,0
T4	4410	497	169	5076	86,9	9,8	3,3	100,0
T5	5655	278	433	6366	88,8	4,4	6,8	100,0
T6	5224	139	168	5531	94,4	2,5	3,0	100,0
Morangueiro*								
T1	4343	363	338	5044	86,1	7,2	6,7	100,0
T45	5700	391	585	6676	85,4	5,9	8,8	100,0

*Amostras de videira (T4, T5 e T6) e de morangueiro 'Dover' (T5) propagados em meio de cultivo, na ausência de BAP; explantes de videira (T1, T2 e T3) e morangueiro 'Burkley' (T2) propagados em meio de cultivo, em presença de 2,0 mg l⁻¹ BAP. Meio MS0: T1 Tampa rígida; T2 Tampa permeável; T3 PVC. Meio MS + BAP: T4 Tampa rígida; T5 Tampa permeável; T6 PVC.

3.6 Análise de isoenzimas

Os géis relativos aos sistemas isoenzimáticos malato desidrogenase (MDH), álcool desidrogenase (ADH) e peroxidase (POD), em folha de videira e morangueiro, são apresentados na Figura 8. À exceção da POD, que migrou em direção ao pólo positivo e ao negativo, a migração das bandas ocorreu no sentido do pólo negativo para o positivo. Todos os sistemas apresentaram variação de presença ou mesmo de intensidade das bandas obtidas.

Notadamente, para POD, nas bandas formadas após migração para ambos os pólos houve marcante variação no tamanho e na intensidade de coloração das mesmas, de uma espécie para a outra e também entre os tratamentos.

O sistema álcool desidrogenase (Figura 8) apresentou maior intensidade de bandas no tratamento T6 em morangueiro. Já em videira, a atividade desse sistema enzimático foi maior nos tratamentos T4 e T6, onde as plantas apresentavam características morfológicas de hiperidricidade.

Quanto à MDH, essa se mostrou mais significativa para videira do que para morangueiro. Em videira, houve maior atividade dessa enzima nos tratamentos não indutores de hiperidricidade (Figura 8).

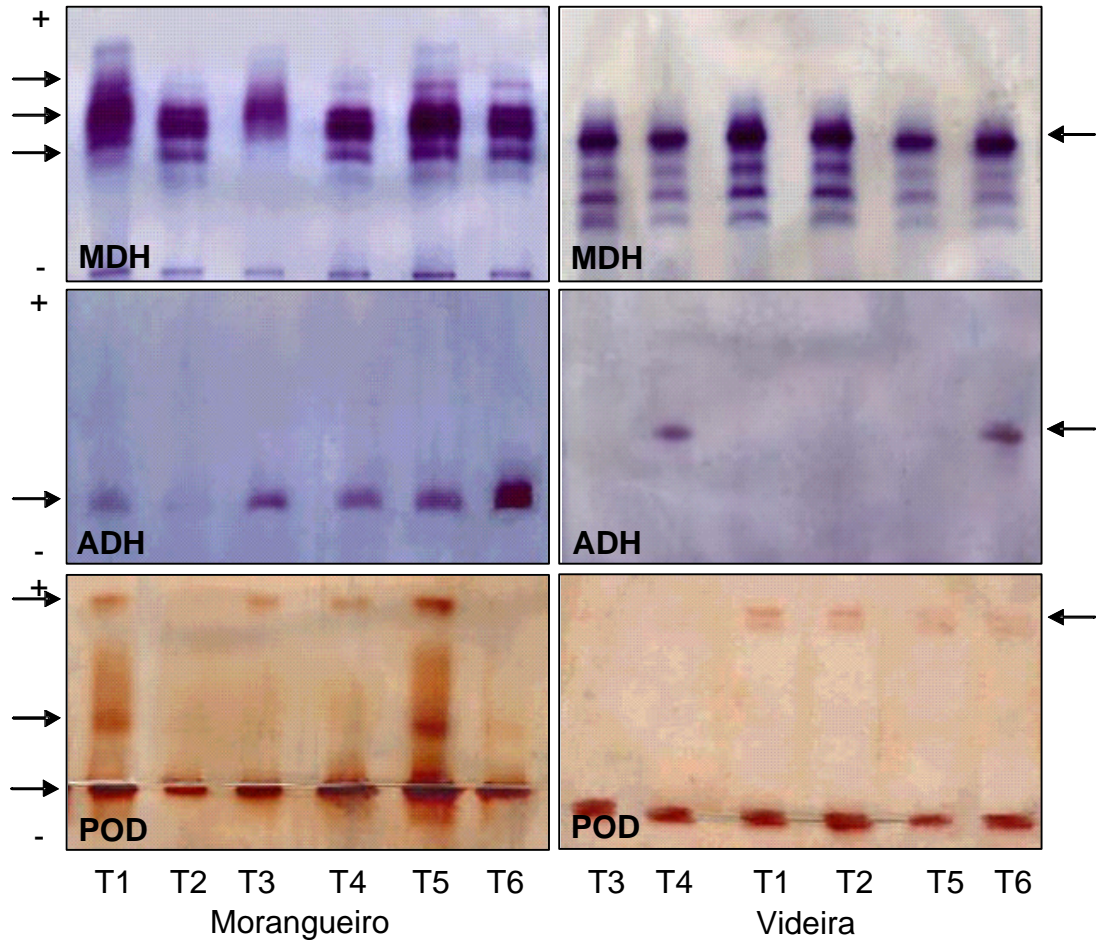


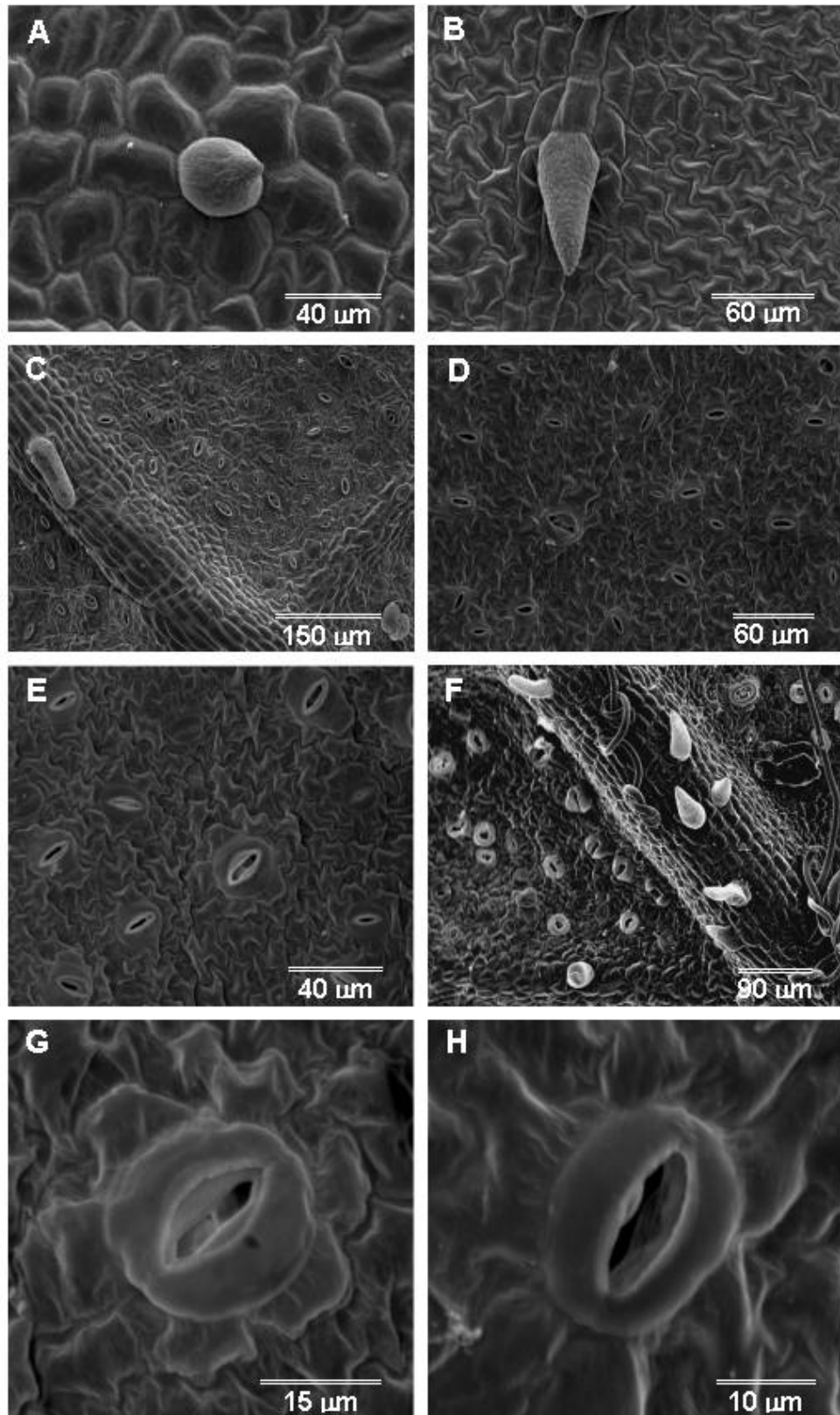
Figura 8. Análise isoenzimática dos sistemas malato desidrogenase (MDH), álcool desidrogenase (ADH) e peroxidase (POD), de folhas de morangueiro e videira em meio indutor (2 mg L^{-1} BAP) e não indutor (sem adição de BAP) de hiperidricidade com diferentes tipos de vedação.

T1, T2 e T3 - meio não indutor + tampa rígida, tampa rígida com membrana permeável e duas camadas de PVC, respectivamente. T4, T5 e T6 - meio indutor + com tampa rígida, tampa rígida com membrana permeável e duas camadas de PVC, respectivamente.

3.7 Microscopia eletrônica de varredura

Foram analisadas as superfícies abaxial e adaxial das folhas do porta-enxerto 'VR 043 – 43' de videira a partir de brotações diferenciadas sob condições indutoras (MS/2) e não-indutoras (MS/2 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP) de hiperidricidade, e sob diferentes vedações. As amostras de folhas normais apresentam estômatos elípticos, posicionados ligeiramente acima do nível das demais células epidérmicas (Figura 9). No entanto, amostras obtidas dos tratamentos indutores de hiperidricidade (T4 e T6) apresentaram células epidérmicas túrgidas (Figura 9 F), possivelmente, devido a mudanças no potencial de água que ocorre nestas células. Seus estômatos apresentam-se maiores que os de plantas normais, com células-guarda mais arredondadas que alongadas, com a parede que delimita o poro estomático protraída e muitas vezes rompida. Nas amostras do tratamento com meio indutor de hiperidricidade, utilizando tampa rígida com membrana permeável a gases, não houve diferença na aparência dos estômatos e das células epidérmicas, em relação aos tratamentos com meio não indutor de hiperidricidade (Figura 9 A, C, E e G).

Figura 9. Eletromicrografias de varredura das superfícies foliares adaxial e abaxial de videira (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* L.) normais propagado *in vitro* em meio não-indutor (MN), na ausência de BAP (A, C, E e G) e hiperídricos propagados *in vitro* em meio de cultivo indutor (MI) com 2 mg L⁻¹ BAP (B, D, F e H), sob diferentes tipos de vedação. (A) face abaxial foliar a partir de ramos cultivados em MN, sob vedação de filme plástico de policloreto de vinila (PVC), evidenciando células epidérmicas e tricomas com padrão de diferenciação normal; (B) face adaxial foliar a partir de ramos cultivados em MI, porém em frasco com vedação de tampa rígida com membrana (TRM). Notar o padrão de diferenciação que se aproxima do normal; (C, E) face abaxial foliar a partir de ramos cultivados sob PVC, em MN, evidenciando estômatos normais; (D); face abaxial folha de videira em MI, porém em frasco vedado com TRM. Notar o padrão de diferenciação que se aproxima do normal; (F) detalhe da face adaxial foliar mostrando estômatos mal-formados, desenvolvidos sob vedação TR e em MI; (G); detalhe de estômato normal a partir de folhas desenvolvidas em MN, sob vedação de PVC; (H). Detalhe de estômato diferenciado em MI, porém em frasco vedado com TRM.



4 DISCUSSÃO

Na cultura de tecidos, normalmente os recipientes utilizados apresentam fechamento semi-hermético, que impedem a entrada de microorganismos e o dessecamento do meio de cultivo. Porém, este tipo de vedação proporciona o aumento da umidade relativa a valores próximos à saturação, além de causar uma grande limitação das trocas gasosas entre a interior do frasco e a sala de crescimento, levando ao acúmulo de gases produzidos pela planta, como etileno, etano e CO₂.

Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de evitar as conseqüências negativas da falta de aeração dos recipientes de cultivo. Kadota et al. (2001) diminuíram a hiperidricidade em pêra japonesa utilizando meio dupla-fase. Park et al. (2004) utilizou um absorvedor de etileno para diminuir as taxas de hiperidricidade em brotos de batata. Marino e Berardi (2004) testaram diferentes combinações de parafilme e PVC em placas de Petri para regeneração de *Cydonia oblonga*. Outra forma de se reduzir as conseqüências negativas da falta de aeração no ambiente de cultivo é a utilização de tampas providas de filtros impermeáveis a microorganismos e que assegurem um gradiente mínimo das pressões parciais dos gases entre a atmosfera interna e externa aos frascos de cultivo (Gonçalves, 2004).

No presente trabalho, foram testados três tipos de vedação em frascos de cultivo, utilizando meio indutor de hiperidricidade e um controle não indutor. Nas duas espécies estudadas, os frascos vedados com PVC e com tampa rígida (TR) apresentaram condensação de água nas paredes internas, tanto em meio indutor como em não indutor de hiperidricidade. Essa condensação somente não foi observada nos frascos vedados com tampa contendo membrana permeável (TP). Dessa forma, pode-se presumir que nestes frascos, cuja perda de água ocorreu facilmente, a umidade relativa tenha sido menor que nos demais tratamentos. A umidade relativa do ambiente interno dos frascos, assim como o potencial de água no meio de cultura, pode influenciar características anatômicas, fisiológicas e morfológicas do explante (Gonçalves, 2004) e são, de acordo com Saher et al. (2004), fatores chaves para o desenvolvimento de hiperidricidade.

Nos frascos vedados com TP a perda de água do meio foi muito maior que nos demais tratamentos o que, provavelmente, modificou a concentração pré-estabelecida de todos os compostos presentes no meio, incluindo sacarose e os macronutrientes diminuindo, conseqüentemente, o potencial osmótico do meio. Este menor potencial osmótico do meio de cultivo comprometeu, provavelmente, a absorção de água pelas plantas de morango, o que pode explicar os menores valores de massa fresca e massa seca encontrados em *Fragaria x ananassa*, sob este tipo de vedação, apesar da maior relação entre massa seca e massa fresca nestas plantas.

Fatores externos podem predispor a condição hiperídrica e estão associados às condições de cultura, a exemplo do tipo de meio e da modalidade de vedação das culturas. Várias estratégias têm sido utilizadas para prevenir ou, ainda, reverter a condição hiperídrica dos tecidos e órgãos em várias espécies de plantas. São relatadas variações no tipo do agente gelificante empregado (Zimmerman e Cobb, 1989; Franck et al., 1998; Pérez-Tornero et al., 2001; Whitehouse et al., 2002) ou no aumento da sua concentração (Debergh et al., 1981; Bornman e Vogelmann, 1984; Pérez-Tornero et al., 2001; Yadav et al., 2003), no tipo de vedação e/ou no aumento das trocas gasosas (Han et al., 1996; Majada et al., 1997; Park et al., 2004), a utilização de compostos antivitrificantes, como EM2 (Whitehouse et al., 2002), a alteração da composição mineral dos meios (Yadav et al., 2003), dentre outros.

Em nosso trabalho, as maiores trocas gasosas preveniram os sintomas visuais da condição hiperídrica em folhas, e a análise ultraestrutural mediante varredura da superfície foliar, apresentou diferenciação dos estômatos próxima daquela observada para a condição normal.

Em videira, o ambiente permeável proporcionou aumento na massa fresca, massa seca e no percentual de massa seca. Um decréscimo na percentagem de massa seca também foi encontrado em brotos de batata cultivados em ambiente totalmente fechado, em relação aos brotos cultivados em ambiente permeável a gás (Park et al., 2004). Kozai et al. (1993), cultivando batata *in vitro* sob diferentes umidades relativas,

observaram diminuição da área foliar com o decréscimo da umidade relativa, apesar de não ter verificado influência na produção de massa seca.

O aumento da massa fresca em plantas hiperídricas é um indício de aumento do percentual de água nos tecidos dessas plantas. Alta umidade relativa induz estresse onde a produção de etileno é aumentada. Isto afeta o processo de lignificação, através de mudanças no balanço de enzimas peroxidases em diferentes tecidos, favorecendo a passagem de água. O acúmulo excessivo de água pode ter gerado os sintomas das células hiperídricas observadas por microscopia em folhas de videira hiperídricas (Pérez-Tornero et al., 2001).

Plantas submetidas aos tratamentos indutores de hiperidricidade T4 (TR) e T6 (PVC) apresentam características de hiperidricidade. Estas plantas apresentaram células epidérmicas túrgidas e estômatos irregulares não funcionais, com células-guarda maiores e mais túrgidas que as de plantas normais. Estas deformações das células-guarda podem ser decorrentes de mudanças estruturais que resultam em mudanças na composição da parede celular (Werker e Leshem, 1987), perda de elasticidade ou por modificações no padrão de deposição de microfibrilas de celulose (Ziv e Ariel, 1992). De acordo com Gaspar et al. (1991), estas alterações nos estômatos são alguns dos fatores que limitam a sobrevivência das plantas hiperídricas nas fases de aclimatização.

Nas amostras do tratamento com meio indutor de hiperidricidade, utilizando tampa rígida com membrana permeável a gases, não houve diferença na aparência dos estômatos e das células epidérmicas, em relação aos tratamentos com meio não indutor de hiperidricidade.

O extravasamento de solutos foi maior em T4 (TR) para morangueiro e também em T6 (PVC), para videira. O tratamento com tampa permeável em meio indutor de hiperidricidade não diferiu significativamente dos demais tratamentos não indutores de hiperidricidade. Porém, em videira, apesar desse fato, este tratamento apresentou elevado extravasamento de solutos, sugerindo danos à membrana.

Em amostras de morangueiro, o sistema enzimático peroxidase teve maior expressão, estando mais ativo nos tratamentos T1 e T5. As plantas submetidas a estes tratamentos não apresentaram características

morfológicas nem ultra-estruturais de hiperidricidade. Porém, neste tratamento, foi verificado que a peroxidação de lipídios não diferiu significativamente dos demais tratamentos indutores de hiperidricidade. Esse fato aliado ao aumento da atividade de peroxidases indica a presença de H₂O₂, compostos fenólicos e/ou hidroperóxidos, que são os principais substratos dessa enzima e contribuem para o aumento da peroxidação de lipídios nos tecidos (Peixoto, 1998). O aumento da atividade de peroxidases em tecidos hiperídricos sugere um mecanismo de defesa contra o aumento da produção de radicais livres, gerados pela condição de estresse. Entretanto, neste tratamento a peroxidação de lipídios foi menor em relação aos demais tratamentos indutores de hiperidricidade sendo, esta diferença, significativa em plantas de videira.

O sistema álcool desidrogenase apresentou maior intensidade de bandas no tratamento T6 em morango. Já em videira, a atividade desse sistema enzimático foi maior nos tratamentos T4 e T6, onde as plantas apresentavam características morfológicas de hiperidricidade.

Quanto à MDH, essa se mostrou mais significativa para videira do que para morangueiro. Em videira, houve maior atividade dessa enzima nos tratamentos não indutores de hiperidricidade, sugerindo um aumento na respiração nesses tratamentos.

De acordo com Abeles et al. (1992), o etileno é produzido naturalmente por todos os tecidos da planta. Por isso, é detectado normalmente na atmosfera de cultivo *in vitro*. Seus níveis variam durante o desenvolvimento e dependem do órgão em cultivo, sendo que os níveis mais altos estão relacionados com tecidos meristemáticos e tecidos estressados ou danificados.

Neste trabalho, plantas de morangueiro e videira apresentaram padrões distintos na produção de etileno. Em morango, diferenças significativas foram observadas a partir do 20º dia de cultivo entre TP e os demais tratamentos com meio indutor de hiperidricidade. Esses resultados conferem com os encontrados por Park et al (2004), que trabalhando com batata, observou acúmulo excessivo de etileno em ambiente totalmente fechado, quando comparado ao ambiente permeável. Dessa forma, o envolvimento do etileno na hiperidricidade torna-se óbvio. Porém, plantas de

videira não apresentaram resultados semelhantes, sendo que não houve diferenças significativas na biossíntese do etileno entre os tratamentos em meio indutor de hiperidricidade. O uso do PVC é justificado pela praticidade de manuseio. Porém, nas espécies estudadas, em especial a videira, foram observados altos níveis de etileno nos tratamentos com PVC em meio indutor de hiperidricidade e no controle não indutor. Este tratamento foi utilizado no estudo como um padrão, uma vez que é o tipo de vedação utilizado rotineiramente em nosso laboratório. Porém, os resultados encontrados mostram que este tipo de vedação pode estar contribuindo para o desenvolvimento de hiperidricidade e de outras anormalidades ligadas ao acúmulo de gases no interior do frasco de cultivo.

Apesar da evidente morfologia hiperídrica dos brotos cultivados em T4 e T6, a análise de citometria de fluxo indicou que os núcleos não sofreram danos significativos entre os tratamentos. Ao contrário do observado para *Prunus avium* (Franck et al., 2004), a condição hiperídrica não alterou os níveis de ploidia em relação aos ramos não hiperídricos. Para confirmar essa hipótese, avaliou-se também os tratamentos normais e hiperídricos de morangueiro 'Burkley'. Os resultados da análise de material hiperídrico (n=3) e normal (n=3) repetiu tendência semelhante àqueles observados para as videiras normais e hiperídricas, confirmando que, nas condições experimentais em que foram conduzidas as pesquisas, não houve alteração nos níveis de ploidia decorrentes da condição hiperídrica.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, pode-se comprovar que:

- O tipo de vedação utilizado influenciou o ambiente interno dos frascos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de hiperidricidade;
- Nos frascos vedados com membrana permeável, mesmo em meio indutor de hiperidricidade, não foram observadas características morfológicas dessa anormalidade, embora seja observado aumento da atividade de peroxidases e de extravasamento de eletrólitos em plantas de videira, submetidas a este tratamento;

- A vedação de frascos com tampa rígida de polipropileno ou filme de PVC, em presença de BAP, promoveu maior índice de hiperidricidade, confirmando que o tipo de vedação dos frascos, em combinação com componentes do meio e condições de cultivo estão relacionados ao surgimento dessa anomalia fisiológica em plantas cultivadas *in vitro*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeles, F. B.; Morgan, P. W.; Saltveit, M. E. **Ethylene in plant biology**. 2^a ed. New York: Academic Press, 1992.

Aitken-Christie, J.; Kozai, T.; Lila-Smith, M. (Eds.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. 500p.

Arimura, C. T. **Propagação in vitro de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) por meio de segmentos nodais estiolados**. Viçosa: UFV, 1997. 62. dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.

Bornman, C.H.; Vogelmann, T.C. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. **Physiologia Plantarum**, 61: 505-512, 1984.

Borsoi Filho, J. L. **Variabilidade isozimática e divergência genética em seis cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Viçosa: UFV, 1995. 52p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.

Bozzola, J. J.; Russel, L. D. **Electron microscopy**. Boston: Jones and Bartlett publishers, 1992. 542 p.

Buege, J.A., Aust, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, 52: 302-310, 1978.

Cassells, A. C.; Curry, R. F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 64: 145-157, 2001.

Conkle, M. T., Hodgskiss, P. D., Nunnally, L. B. **Starch gel eletroforesis conifer seeds: a laboratory manual**. Berkeley, USDA: Forest Service, 1982. 18p.

Dantas, A.K.; Majada, J.P.; Fernández, B.; Canal, M.J. Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions. **Plant Growth Regulation**, 33: 237-243, 2001.

Debergh, P., Harbaoui, Y.; Lemeur R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. **Physiologia Plantarum**, 53: 181-187, 1981.

Dhindsa, R. S.; Plumb-Dhindsa, P.; Thorpe, T. A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. **Journal of Experimental Botany**, 32: 93-101. 1981.

Dole el, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**. 2: 143-154, 1991.

Dole el J, Sgorbati S, Lucretti S. Compararison of threee DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Physiologia Plantarum**, 85: 625-631, 1992.

Franck, T.; Crèvecoeur, M.; Wuest, J.; Greppin, H.; Gaspar, T. Cytological comparison of leaves and stems of *Prunus avium* L. shoots cultured on a solid medium with agar or gelrite. **Biotechniques and Histochemistry**, 73: 32-43, 1998.

Franck, T.; Kevers, C.; Gaspar, T.; Dommès, J.; Deby, C.; Greimers R.; Serteyn, D.; Deby-Dupont, G. Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response. **Plant Physiology and Biochemistry**, 42: 519-527, 2004.

Gaspar T.; Hagège, D.; Kevers, C.; Penel, C.; Crèvecoeur, M.; Engelmann, I.; Greppin, H.; Foidart, J. M. When plant teratomas turn into cancers in the absence of pathogens. **Physiologia Plantarum**, 83: 696-701, 1991.

Gonçalves, L. A. *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae): anatomia, citogenética, citometria de fluxo e propagação *in vitro*. Viçosa: UFV, 2004. 88p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, 2004.

Han, B. H.; Joung, H. Y.; Choi, J. K.; Paek, K. Y. Effects of sealing materials and relative humidity of culture vessels on growth, vitrification and nutrient contents in *in vitro* plantlets of *Gypsophila paniculata* 'Bristol Fairy'. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, 36: 886-892, 1996.

Kadota, M.; Imizu, K.; Hirano, T. Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, 89: 207-213, 2001.

Karnovsky, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27: 137-138, 1965.

Kozai, T.; Tanaka, K.; Jeong, B. R.; Fujiwara, K. Effect of relative humidity in the culture vessel on the growth and shoot elongation of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets *in vitro*. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**. 62(2): 413-417, 1993.

Majada, J.P., Fal, M.A.; Sánchez-Tamés, R. The effect of ventilation rate on proliferation and hyperhydricity of *Dianthus caryophyllus* L. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 33: 62-69, 1997.

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

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.

Park, S.W.; Jeon, J.H.; Kim, H.S.; Park, Y.M.; Aswath, C.; Joung, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, 99: 199-205, 2004.

Peixoto, P. H. P. **Peroxidação de lipídios em membranas e tecidos de dois cultivares de sorgo (*sorghum bicolor* (L.) Moench) com tolerância diferencial ao alumínio**. Viçosa: UFV, 1998. 112 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.

Pérez-Tornero, O.; Egea, L.; Olmos, E.; Burgos, L. Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 37: 250-254, 2001.

Saher, S.; Piqueras, A.; Hellin, E.; Olmos, E. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, 120: 152-161, 2004.

Toledo, J.U.; Spomer, L.A.; Smith, M.A.L. Changes in media water status during preparation and storage, **Biotronics**, 26: 59-66, 1997.

Werker, E.; Leshem, B. Structural changes during vitrification of carnation plantlets. **Annals of Botany**, 59: 377-385, 1987.

Whitehouse, A.B.; Marks, T.R.; Edwards, G.A. Control of hyperhydricity in *Eucalyptus* axillary shoot cultures grown in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 71: 245-252, 2002.

Zimmerman, T.W.; Cobb, B.G. Vitrification and soluble carbohydrate levels in *Petunia* leaves as influenced by media, gelrite and sucrose concentration. **Plant Cell Reports**, 8: 358-360, 1989.

Ziv, M., Ariel, T. On the relation between vitrification and stomatal cell wall deformity in carnation leaves *in vitro*. **Acta Horticulturae**, 314: 121-129, 1992.

Yadav, M.K.; Gaur, A.K.; Garg, G.K. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 72: 153-156, 2003.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que:

- O aumento da concentração de citocinina leva ao desenvolvimento de hiperidricidade em ambas as variedades estudadas;
- Nas concentrações até $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, a substituição de Ágar por Phytigel[®] no meio de cultivo induz maior formação de brotos hiperídricos;
- O desenvolvimento de hiperidricidade está intimamente relacionado ao estresse oxidativo, caracterizado por aumento da atividade de enzimas antioxidantes e da peroxidação de lipídios, alterações em nível celular, como malformações de estômatos e de células epidérmicas, além de aumento na produção de etileno no interior dos frascos de cultivo;
- O tipo de vedação utilizada nos frascos, em combinação com componentes do meio e condições de cultivo, influencia o ambiente interno dos frascos, estando, conseqüentemente, relacionado ao desenvolvimento de hiperidricidade em plantas cultivadas *in vitro*.
- A utilização de membranas permeáveis a gases na vedação de frascos de cultivo é um método eficaz para a obtenção de plantas não hiperídricas.