

Atividade enzimática da superóxido dismutase em resposta aos fitorreguladores em *Gerbera jamesonii*

Rita Cassia Alves Nunes¹, Ronaldo Silva Viana^{*2}, Nelson Barbosa Machado Neto³

¹Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brasil

²Faculdade de Tecnológica, Araçatuba, SP, Brasil

³Universidade do Oeste Paulista-Campus II, Presidente Prudente, SP, Brasil

*Autor correspondente, e-mail: ronaldodsv@hotmail.com

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta dos fitorreguladores benzilaminopurina e ácido naftalenoacético em diversas concentrações nos explantes foliares de gérbera para a obtenção de calos embriogênicos e a utilização de superóxido dismutases (SOD) como marcador bioquímico na avaliação para seleção dos calos em *Gerbera jamesonii* cv. Cherry. As folhas completamente expandidas foram retiradas das plantas de *Gerbera jamesonii* cv. Cherry cultivadas em vaso, desinfetadas, seccionadas em fragmentos de aproximadamente 1cm² e inoculadas em meio de cultura MS em combinação fatorial 5x5 de reguladores de crescimento: benzilaminopurina-BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e ácido naftalenoacético-ANA (0,0; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹). Os calos foram avaliados em dois períodos, aos 30 e 60 dias observando-se o crescimento e coloração. A melhores combinações de fitoreguladores de crescimento para obtenção de calos friáveis foram 1,0/1,0 mg L⁻¹ de BAP/ANA, 1,0/2,0 mg L⁻¹ de BAP/ANA, 0,5/0,5 mg L⁻¹ de BAP/ANA respectivamente. Houve um incremento na atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) quando utilizada a combinação dos fitohormônios 2,0/2,0 e 4,0/1,0 mg L⁻¹ de BAP/ANA e conseqüentemente menor crescimento de calos.

Palavras chave: biorregulador, cultura de tecidos, embriogênese somática, planta ornamental

Superoxide dismutase enzyme activity in response to plant hormones in *Gerbera jamesonii*

Abstract

The objective of this study was to evaluate best concentrations of phytohormones benzylaminopurine and naphthalene acetic acid in various concentrations in leaf explants of gerbera for obtaining somatic embryogenesis and the use of superoxide dismutases (SOD) as a biochemical marker for the evaluation selection of calluses *Gerbera jamesonii* cv. Cherry. Fully expanded leaves of plants *Gerbera jamesonii* cv. Cherry were submitted to the disinfection, cut in fragments (1cm²) and inoculated in MS media in a factorial growth phytohormones combination (5x5): benzylaminopurine-BAP (0; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg.L⁻¹) and naphthaleneacetic acid-ANA (0; 0.25; 0.50; 1.0 and 2.0 mg.L⁻¹). The calluses were evaluated in two periods at 30 and 60 days observing the growth and coloration. The best combination of growth phytohormones to obtain friable calluses were 1.0 / 1.0 mg.L⁻¹BAP / NAA, 1.0 / 2.0 mg.L⁻¹ BAP / NAA, 0.5 / 0.5 mg.L⁻¹BAP / NAA respectively. There was an increase in the enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) when used combination of phytohormones 2.0 / 2.0 and 4.0 / 1.0 mg.L⁻¹BAP / NAA and consequently lower growth of calluses.

Keywords: bioregulator, tissue culture, somatic embryogenesis, ornamental plant

Introdução

A gérbera (*Gerbera jamesonii*, Asteraceae) é uma planta semiperene, nativa da África do Sul e Ásia e que nos últimos anos teve um crescente interesse pelos tipos de corte, pois suas flores apresentam boa durabilidade e uma variação de cores que satisfaz os mercados mais exigentes.

As plantas têm várias maneiras de reproduzirem e com a ajuda do homem as possibilidades aumentam. Uma destas é a reprodução sexuada que permite uma grande vantagem seletiva. A diversidade genética pode ser vantajosa à população quando o ambiente é modificado ou quando a população se expande para novos ambientes. A adaptabilidade resultante da diversidade genética é a principal vantagem deste tipo de reprodução (Purves et al., 2005).

A micropropagação é uma das principais aplicações da cultura de tecidos, especialmente para plantas de difícil propagação pelos métodos convencionais, como é o caso da *Gerbera*. O emprego de cultura de tecidos tem sido crescente para esta, tornando-se uma alternativa bastante viável para sua propagação. As primeiras tentativas neste sentido foram feitas por Pierik & Segers (1973) na Holanda, que empregaram a indução em gemas adventícias. Particularmente na área de plantas ornamentais onde predominam plantas híbridas, a clonagem de matrizes selecionadas tem permitido a uniformização de época de floração, coloração, diâmetro e forma das flores.

Trabalhos realizados por Handro & Floh (1990) relatam que a organogênese é controlada pela concentração e balanço citocinina/auxina existentes em meio de cultura sendo a citocinina muito ativa na indução e regeneração de parte aérea das plântulas inibindo a formação de raízes e crescimento de parte aérea. Por outro lado, estimula a formação de gemas axilares, o que leva a formação de calos comandada pela auxina.

Por isto, é importante estudar certas enzimas associadas ao estresse causado pelo excesso de oxidantes no mecanismo de defesa de plantas. A superóxido dismutase (SOD) tem

um papel importante na ajuda e eliminação dos radicais livres. Assim como o peróxido de hidrogênio que é altamente tóxico para as células (Albrecht et al., 2009).

Altas atividades de SOD estão relacionadas a uma maior produção de peróxido de hidrogênio que é molécula chave para vários processos metabólicos dentro da célula desde a produção de radicais livres até lignificação e produção de compostos fenólicos, além de atuar como gatilho para as respostas de resistência sistêmica adquirida (SAR).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta dos fitorreguladores benzilaminopurina e ácido naftaleno acético em diversas concentrações nos explantes foliares de gérbera para a obtenção de calos embriogênicos e a utilização de superóxido dismutases (SOD) como marcador bioquímico na avaliação para seleção dos calos.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da UNOESTE Universidade do Oeste Paulista – Presidente Prudente-SP. O material vegetal utilizado como matriz foi obtido de *Gerbera jamesonii* cv. Cherry, comercializadas em vaso, no Ceasa da cidade de Presidente Prudente-SP.

Foram selecionadas folhas jovens completamente expandidas com aparência saudável, sem manchas e pragas. As folhas ao serem retiradas, foram lavadas em água corrente com detergente neutro, transferidas para câmara de fluxo laminar e submetidas à desinfecção com hipoclorito de sódio comercial (40% v/v) e 100µL de Tween 80 durante 30 minutos. As folhas foram lavadas duas vezes em água destilada, mergulhadas em solução estéril de cisteína (500mg L⁻¹): ácido ascórbico, na dose de (500mg L⁻¹), misturados na hora do uso, para evitar a oxidação dos tecidos e foram cortadas em peças de 1cm².

Os fragmentos foram incubados em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, contendo meio MS sem adição de reguladores de crescimento vegetal para seleção dos explantes. Os fragmentos não contaminados ou oxidados foram utilizados para a incubação no meio de

cultura contendo reguladores de crescimento vegetal em diferentes concentrações que constituíram os tratamentos.

O meio de cultura utilizado foi MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado, suplementado com 20g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2,0g L⁻¹ de Phytigel® e pH 5,8. Os frascos do tipo maionese, 269 unidades, contendo 50 mL de meio, foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1 atm de pressão. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram instalados em fatorial 5 x 5 sendo considerados como fatores as concentrações de benzilaminopurina (BAP: 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0mg /L⁻¹) e ácido naftalenoacético (ANA: 0,0; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0mg L⁻¹) com dez repetições de dois explantes por frasco. Os frascos permaneceram em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura 25± 2°C. Após 30 dias, os calos obtidos foram medidos, classificados por cor e transferidos para meio de cultura novo, com as mesmas características do anterior, e mantidos por mais 30 dias; ao final dos 60 dias se refizeram as medidas. Os calos foram classificados visualmente e receberam notas quanto a coloração (1 - branco, 2 - amarelo, 3 - verde e 4 - marrom), e foram mantidos em cultura por dois períodos: 30 e 60 dias após inoculação no meio conforme Termignoni (2005).

A determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) foi realizada pela adição de 50µL de extrato bruto a uma solução contendo 13mM de metionina, 75µM de NBT, 100mM de EDTA e 2µM de riboflavina em 3,0mL de tampão fosfato de potássio 5mM, pH7,8. A reação foi iniciada pela iluminação dos tubos, em câmara composta por tubos fluorescentes, a 25°C. Após 15 minutos de incubação, o final da catálise foi determinado pela interrupção da luz. O composto azul formado (formazana) pela fotorredução do NBT foi determinado pela leitura em espectrofotômetro a 560nm. Os tubos considerados brancos para análise receberam os mesmos reagentes, porém foram mantidos cobertos com papel alumínio e abrigados da luz. Para cálculo da atividade específica da enzima, considerou-se a porcentagem de inibição obtida, o volume da amostra e a concentração

de proteína na amostra (µg/µL). Cada 50% de inibição de fotorredução representa uma unidade de SOD, sendo que esta foi definida como a quantidade de enzima requerida para inibir 50% da fotorredução do NBT.

Para a análise estatística foi utilizado o teste t de Student para comparar as médias amostrais; para análise de correlação simples entre as variáveis: superóxido dismutase (SOD), tamanho, friabilidade e cor utilizou-se o programa Assistat 7.6 Beta; e o software GraphPad Software versão 3.05, 32 bit for Win 95/NT (Copyright © 1992-2000) foi utilizado para gerar os gráficos.

Resultados e Discussão

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostraram que os melhores desempenhos foram apresentados com as combinações: 1,0mg.L⁻¹ de BAP + 1,0mg.L⁻¹ de ANA, isto é, o maior desenvolvimento de calo em tamanho, atingindo a média de 2,83 cm seguidos pelos tratamentos de 0,5mg.L⁻¹ de BAP + 2,0mg.L⁻¹ de ANA, 1,0mg.L⁻¹ de BAP + 2,0mg.L⁻¹ de ANA, no período de 30 e 60 dias de cultivo. Os tratamentos apresentaram diferenças significativas no tamanho, devido ao tempo de contato com os meios de cultura contendo combinações diferentes concentração dos fitoreguladores citocinina/auxina conforme apresentado na Tabela 1. Resultados semelhantes foram obtidos por Silva et al., (2003) em que calos de carqueja (*Baccharis* sp., Asteraceae) só cresceram quando cultivados em meio de cultura contendo ANA conjuntamente com benzilaminopurina (BAP). Rezende et al. (2008), trabalharam com o regulador ANA no cultivo de capítulos florais de *Gerbera jamesonii* e obtiveram formação de calos grandes, utilizando o meio de cultura MS, o que demonstra a possibilidade de formação de brotos e folhas.

Segundo Huetteman & Preece (1993) e Laszloffy et al. (1992) a alta concentração de citocininas no meio induz a formação excessiva de calos. A formação de calos em discos foliares como observado neste trabalho é fato bem documentado em cultura de tecidos sendo comum em várias espécies como *Smilax japecanga* (Smilacaceae) e *Coffea arabica*

(Rubiaceae) (Santos et al., 2005) e *Passiflora suberosa* (Passifloraceae) (Monteiro et al., 2000).

Tabela 1. Tamanho (cm) dos calos em explantes de *Gerbera jamesonii* cv. Cherry cultivados em meio MS acrescido de diferentes concentrações de BAP e ANA aos 30 e 60 dias. Presidente Prudente-SP.

Meio Básico	Fitorreguladores		Calogênese (cm)		
	BAP (mg.L ⁻¹)	ANA (mg.L ⁻¹)	30 dias	60 dias	Média
MS	0	0	0	0	0
		0,25	1,67	1,00	1,33
		0,5	1,83	2,00	1,92
		1,0	0	0	0
	0,5	2,0	1,67	2,67	2,17
		0	0	0	0
		0,25	1,67	2,00	1,83
		0,5	1,83	2,67	2,25
	1,0	1,0	1,67	3,00	2,33
		2,0	2,00	3,00	2,50
		0	0	0	0
		0,25	1,50	2,33	1,92
	2,0	0,5	1,67	2,00	1,83
		1,0	2,00	2,00	2,00
		2,0	1,00	1,00	1,00
		0	0	0	0
4,0	0,25	1,00	1,00	1,00	
	0,5	1,00	1,00	1,00	
	1,0	1,17	2,00	1,58	
	2,0	1,50	3,00	2,25	
Média	-	-	1,21	1,64	1,42
CV	-	-	0,65	0,69	0,66

Os valores médios dos tamanhos dos calos avaliados aos 30 e 60 dias é significativo pelo teste t de Student ao nível de decisão $\alpha=1$ ($p \leq 0,01$).

Os calos formados apresentaram variação de cores nos tratamentos 2,0mg.L⁻¹ de BAP+2,0mg.L⁻¹ de ANA, 0,5mg.L⁻¹ de BAP+0,5mg.L⁻¹ e 1,0mg.L⁻¹ de BAP + 1,0mg.L⁻¹ de ANA (Tabela 2); os calos mais claros, brancos até amarelos ou verdes claros foram mais friáveis, ou seja, com maior potencialidade para embriogênese. Tais calos apresentaram embriões em diversos estágios de maturação inicial com células com divisão assimétrica, embriões em estágios iniciais multicelulares e embriões somáticos cordiformes. Os calos, marrons e verdes escuros, tendem a ser mais duros, se mostrando menos friáveis.

Cerqueira et al., (2002) observaram que a coloração e a consistência de calos de erva-de-touro (*Tridax procumbens* L., Asteraceae), cultivados *in vitro*, dependeram tanto da

concentração como do tipo de regulador de crescimento utilizado no meio de cultura, sendo a cor verde a mais predominante, e está relacionada aos reguladores ANA e BAP.

Na Tabela 2 observou-se que em quase todos os explantes foliares de gérbera ocorreu a formação de calos friáveis ou vitrificados, tratamentos sem auxina não induziram calos.

Tabela 2. Coloração e friabilidade dos calos em explantes de *Gerbera jamesonii* cv. Cherry, cultivados em meio MS acrescido de diferentes concentrações de BAP e ANA aos 30 e 60 dias. Presidente Prudente-SP.

Tratamento		Coloração		Friabilidade	
BAP	ANA	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
(mg L ⁻¹)					
0	0	0e	0c	0d	0d
0	0,25	1,66d	3,49 ^a	0,49c	1,82b
0	0,5	1,69d	3,49 ^a	0,49c	1,50b
0	1,0	0e	0c	0d	0d
0	2,0	2,61c	3,49 ^a	0,49c	0,49c
0,5	0	0e	0c	0d	0d
0,5	0,25	3,33b	3,49 ^a	1,62b	1,50b
0,5	0,5	3,49b	3,49^a	2,31a	2,50^a
0,5	1,0	3,49b	2,50b	2,31a	1,50b
0,5	2,0	3,49b	2,50b	2,31a	1,50b
1,0	0	0e	0c	0d	0d
1,0	0,25	3,33b	2,50b	2,31a	1,50b
1,0	0,5	3,33b	2,50b	2,50a	1,50b
1,0	1,0	3,80a	2,50b	2,31a	1,50b
1,0	2,0	3,49b	3,49 ^a	2,31a	1,50b
2,0	0	0e	0c	0d	0d
2,0	0,25	3,49b	3,49 ^a	2,31a	1,50b
2,0	0,5	2,65c	3,49 ^a	2,50a	1,50b
2,0	1,0	2,50c	3,49 ^a	2,50a	0,49c
2,0	2,0	3,97a	3,49 ^a	2,31a	1,50b
4,0	0	0e	0c	0d	0d
4,0	0,25	3,49b	3,49 ^a	2,31a	1,50b
4,0	0,5	3,49b	3,49 ^a	2,31a	1,50b
4,0	1,0	3,49b	3,49 ^a	2,31a	1,50b
4,0	2,0	3,49b	3,49 ^a	2,31a	1,50b
Média		2,80	2,84	1,52	1,56
CV				7,32	

Para as médias de coloração e friabilidade foram atribuídas Notas segundo os seguintes critérios de Coloração: 1 branco, 2 amarelos, 3 verdes e 4 marrons. Para Friabilidade foram: 1 vítreo, 2 intermediários e 3 friável. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo de Teste de Student a 5% de probabilidade

A ocorrência de calos friáveis, segundo Cid (1998), pode ser devida a relações mais elevadas auxina/citocinina, ou pelo fato de os calos terem sido cultivados em presença de luz, conferindo, geralmente, maior friabilidade que os cultivados em ausência de luz. Resultados semelhantes foram observados por vários autores para outras espécies de plantas, como *Ambrosia tenuifolia* Spreng (Asteraceae) (Goleniowski et

al., 1992;).

Os resultados observados na Figura 1 demonstram que houve um incremento nos valores médios da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) quando utilizado a combinação dos fitohormônios 2,0mg.L⁻¹ BAP + 2,0mg.L⁻¹ ANA seguida pela combinação de 4,0mg.L⁻¹ de BAP + 1,0mg.L⁻¹ ANA aos 30 e 60 dias de cultivo; enquanto os menores valores da atividade enzimática da SOD foram encontrados nos tratamentos 0,0mg.L⁻¹ de BAP + 0,25mg.L⁻¹ de ANA. Estes resultados corroboram com as várias pesquisas que constataram que as espécies reativas ao oxigênio levam a uma alteração no padrão de expressão de proteínas e enzimas das

plantas, podendo ocorrer tanto à inibição quanto a indução da biossíntese de determinados constituintes proteicos (Soares & Machado 2007). Quando o sistema de defesa induzido é ativado, ele inclui a rápida geração de espécies reativas de oxigênio, alterações em polímeros da parede celular, síntese de metabólitos de baixo peso molecular e a produção de novas classes de proteínas relacionadas com a defesa celular (Shewry & Lucas 1997). Tem sido relatado que as atividades da superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) foram significativamente maiores em tecidos hiperídricos que em tecidos normais (Wu et al., 2009).

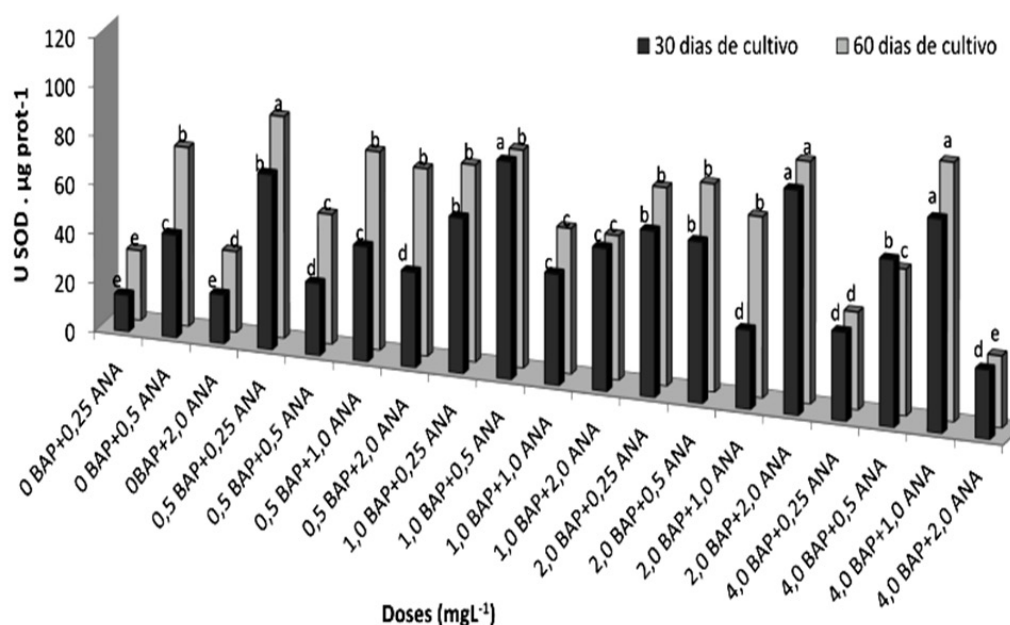


Figura 1. Atividade da SOD em calos de gérbera avaliados aos 30 dias de cultivo e após serem submetidos a estresse hídrico aos 60 dias de cultivo. O Teste t mostra que a médias entre os tratamentos é significativa com $p < 0,05$ e com intervalo de confiança de 95%. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si

Na Figura 2 pode ser observado os valores médios da porcentagem da atividade específica da SOD aos 30 e 60 dias de cultivo e verificou-se que a atividade da SOD apresentou as maiores médias aos 60 dias de cultivo. Estes dados estão em conformidade com Dewir et al., (2006) que observaram que as plantas possuem um complexo sistema antioxidativo constituído por enzimas e metabólitos antioxidativos que podem ser capazes de prevenir o acúmulo de espécies reativas ao oxigênio (ERO) e o estresse oxidativo (Saher et al., 2004). Problemas relativos à qualidade fisiológica de plantas, células,

tecidos e órgãos cultivados *in vitro*, tais como hiperidricidade, uso de fitohormônio têm sido diagnosticados como consequência de estresse oxidativo ocasionado por diversos fatores abióticos que acarretam o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Cassells & Cury 2001). As enzimas e os metabólitos do sistema antioxidativo são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico servindo como sinalizadoras do estresse. O melhor entendimento das bases fisiológicas e bioquímicas em relação à reação ao estresse é de grande interesse para prevenir anormalidades (Wu et al., 2009).

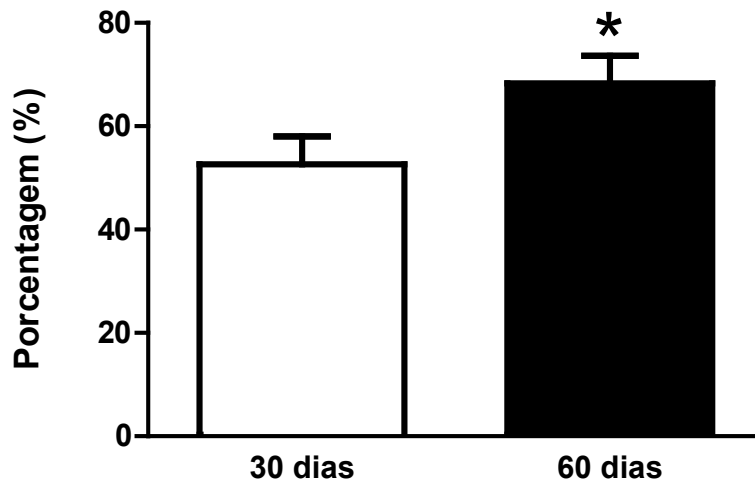


Figura 2. Atividade da SOD em calos de *Gerbera jamesonii* cv. Cherry, avaliados aos 30 e 60 dias de cultivo (30 dias de cultivo 52,63 ± 23,46 e 60 dias de cultivo 68,32 ± 23,29). Presidente Prudente-SP.

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que houve uma correlação positiva entre todas as variáveis analisadas. Assim, a atividade da enzima superóxido dismutase está ligada ao crescimento, friabilidade e coloração do calo. O crescimento de células e calos em cultura de tecidos ocorre em ritmo acelerado, o que geraria uma maior concentração de radicais livres estimulando a síntese de enzimas antioxidantes, os quais teriam então dupla finalidade de desintoxicação e fornecer moléculas para biossíntese celular. Todavia, isto poderia levar a um desequilíbrio celular favorecendo o escurecimento dos calos pela formação e ação dos compostos fenólicos, tornando os calos extremamente vítreos pelo possível aumento de lignina.

Tabela 3. Análise de correlação simples entre as variáveis Atividade de SOD, Tamanho, Friabilidade e Cor de calos de explantes foliares de *Gerbera jamesonii*, obtidos em diferentes tratamentos com fitoreguladores (BAP/ANA). Valores de correlação (r) seguidos de ** são significativos ao nível de 1%

	SOD	Tamanho	Friabilidade	Cor
SOD	1	-	-	-
Tamanho	0,8180**	1	-	-
Friabilidade	0,6141**	0,7747**	1	-
Cor	0,7052**	0,7961**	0,8989**	1

Valores de correlação (r) seguidos de ** são significativos ao nível de 1%

Conclusões

Os segmentos foliares de gérbera representam uma ótima fonte para indução de calogênese e são dependentes de ANA para a formação de calos. A melhor combinação de fitoreguladores de crescimento para obtenção de calos friáveis são 1,0/1,0 mg L⁻¹ de BAP/ANA, 0,5/0,5 mg L⁻¹ de BAP/ANA, 1,0/2,0 mg L⁻¹ de BAP/ANA, respectivamente aos 60 dias após o cultivo.

Há um incremento na atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) quando utilizada a combinação dos fitohormônios 2,0/2,0 e 4,0/1,0 mg L⁻¹ de BAP/ANA, 60 dias após o cultivo.

Referências

Albrecht, L.P., Braccini, A.L., Ávila, M.R., Barbosa, M.C., Ricci, T.T., Albrecht, A.Jr.P. 2009. Aplicação de biorregulador na produtividade do algodoeiro e qualidade de fibra, *Scientia Agraria* 10: 191-198.

Cassells, A.C., Cury, R.F. 2001. 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.

Copyright By Graphpad Software, Inc, All Rights Reserved. Used of this software is subject to the conditions contained on the accompanying software Licence Agreement, InStat is a registered trademark of GraphPad Software Inc. © 1992-2000.

Cerqueira, E.S., Pinto, J.E.B.P., Morais, A.R., Castro, N.E.A., Cardoso, M.G., Lameira, O.A.

2002. Indução de calos em erva-de-touro (*Tradax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. *Ciência e Agrotecnologia* 26: 301-308.
- Cid, L.P.B., Suspensão celular. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. 1998. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa Hortaliças, Brasília, Brasil. p331-353.
- Dewir, Y.H., Chakrabarty, D., Ali, M.B., Hahna, E.J., Paek, K.Y. 2006. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. *Environmental and Experimental Botany* 58: 93-99.
- Goleniowski, M. E., Silva, G.L., Trippi, V.S. 1992. Effect of phytohormones on sesquiterpene lactone production in callus culture of *Ambrosia tenuifolia*. *Phytochemistry* 31: 2359-2361.
- Handro, W., Floh, E.I.S. 1990. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: Torres, A.C., Caldas, L.S. (Ed.). *Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*, ABCTP/EMBRAPA/CNPQ, Brasília, Brasil. p. 203-212.
- Huetteman, C.A., Preece, J.E. 1993. Thiadiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 105-119.
- Laszloffy, K., Abdul Kader, A.M., Mathé, A. 1992. *In vitro* propagation of 'Julyred' apple. *Acta Horticulturae*,300: 149-154.
- Monteiro, A.C.B.A., Nakazawa, G.T., Mendes, B.M.J., Rodriguez, A.P.M. 2000. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. *Scientia Agrícola* 57: 571-573.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Pierik, R.L.M., Segers, T.A. 1973. *In vitro* culture of midrib explants of *Gerbera*: adventitious root formation and callus induction. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie* 69: 204-212.
- Purves, W.K., Sadava, D., Orians, G.H., Heller, H.C. 2005. *Vida: a ciência da biologia*, Artmed, Porto Alegre, Brasil, p. 355.
- Rezende, R.K.S., Paiva, L.V., Paiva, R., Júnior, A.C., Torga, P.P., Castro, E.M. 2008. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. *Ciência e Agrotecnologia* 32: 821- 827.
- Santos, B.R., Paiva, R., Martinotto, C., Nogueira, R.C., Paiva, P.D.O. 2005. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). *Ciência Rural* 35: 510-514.
- Saher, S., Piqueras, A., Hellin, E., Olmos, E. 2004. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum* 120: 152-161.
- Silva, F.G., Pinto, J.E.B.P., Sales, J.F., Divino, S.P., Bertolucci, S.K.V. 2003. Efeito da concentração de sais e fitoreguladores na indução de calos em carqueja. *Ciência e Agrotecnologia* 27: 541-547.
- Soares, A.M.S., Machado, O.L.T. 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Tropica – Ciências Agrárias e Biológicas* 1:1-10.
- Shewry, P.R., Lucas, J.A. 1997. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. *Advances In Botanical Research Incorporating Advances In Plant Pathology* 26:135-192.
- Termignoni, R. R. *Cultura de Tecidos Vegetais*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 182 p., 2005.
- Wu, Z, Chen, L.J., Long, Y.J. 2009. Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 5: 483-490.