

INFLUÊNCIA DA DENSIDADE DE FLUXO LUMINOSO NA QUALIDADE DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *Gypsophila paniculata* L.

RADMANN, Elizete B. ¹; BRAGA, Eugenia J. B. ²; KARAN, Marco A. L. ³; POSADA, Mário A. C. ³; PETERS, José A. ⁴

¹ FAEM/UFPeI Caixa Postal 354 Pelotas – RS CEP 96010-900

² Centro de Biotecnologia/UFPeI Caixa Postal 354 Pelotas – RS CEP 96010-900

³ Instituto de Biologia/UFPeI Caixa Postal 354 Pelotas – RS CEP 96010-900

⁴ CEPLAC - Itabuna/BA

(Recebido para publicação em 26/10/2000)

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com objetivo de avaliar o efeito de densidades de fluxo luminoso na multiplicação de *Gypsophila paniculata* L. e sua influência no enraizamento e aclimatização. Utilizou-se o meio MS, com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol e 10 g.L⁻¹ de ágar. Como explantes foram utilizados microestacas com duas gemas axilares, as quais foram colocadas em diferentes luminosidades (15,705; 41,88 e 83,76 W.m⁻²), fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 23 ± 2°C. Avaliaram-se nesta fase, o número e comprimento dos brotos, número de entrenós/broto, coloração e presença de vitrificação. Não houve diferença significativa entre as densidades de fluxo luminoso para número de brotos e número de entrenós. Entretanto, plantas cultivadas sob menor densidade de fluxo luminoso (15,705 W.m⁻²) apresentaram maior comprimento. Não foi observado a ocorrência de vitrificação nos brotos, independente da densidade de fluxo luminoso utilizado. Brotos cultivados em menor luminosidade apresentaram coloração verde-brilhante, enquanto que aqueles desenvolvidos sob 41,88 e 83,76 W.m⁻² eram verde-opaco. Para a fase de enraizamento, brotos com no mínimo 2,0 cm foram imersos por três minutos em solução de 100,0 mg.L⁻¹ de AIB e depois transferidos para substrato constituído por casca de arroz queimado, para sua aclimatização. Trinta dias após a transferência, foram avaliados a percentagem de plantas enraizadas, peso de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular. Brotos, independente da densidade de fluxo luminoso na fase de multiplicação, apresentaram 100% de enraizamento, sendo que os oriundos de 83,76 e 41,88 W.m⁻² apresentaram maior peso de matéria fresca e seca.

Palavras-chave: Multiplicação, enraizamento, aclimatização, in vitro, luz.

ABSTRACT

INFLUENCE OF THE LUMINOUS FLOW DENSITY ON THE QUALITY OF MICROPROPAGATED *Gypsophila paniculata* L. PLANTS. This work was performed aiming to evaluate the effect of luminous flux density on the multiplication of *Gypsophila paniculata* L. and its influence on rooting and acclimatization. The MS nutrient medium added to sucrose (30 g.L⁻¹), myo-inositol (100 mg.L⁻¹) and agar (10 g.L⁻¹) was used. The explants employed were 2-bud microcuttings which were subjected to different radiations (15,705; 41,88 and 83,76 W.m⁻²), 16-hour photoperiod and a temperature of 23 ± 2°C. At this phase the shoot number and shoot length, number of internodes/shoot, colour and incidence of vitrification were evaluated. No significant differences were observed among the flux densities for shoot number and number of internodes. However, plantlets cultivated under low flux density (15,705 W.m⁻²) presented higher shoot length. The incidence of vitrification in the shoot leaves were not observed independently of the luminous flux density used. Shoots being cultivated under low luminous flux density showed a brilliant-green coloration, while those developed under 41,88 and 83,76 W.m⁻² were opaque-green. For the rooting phase and acclimatization, shoots with at least 2,0 cm were dipped in 100,0 mg.L⁻¹ IBA solution for three minutes and later transferred to burned rice husk substrate. The rooting percentage was evaluated 30 days after transferring by measuring the weight of fresh and dry matter of the aerial part and

roots. The shoots, independently of the luminous flux density, presented 100% rooting. Shoots under 83,76 and 41,88 W.m⁻² presented a higher weight of fresh and dry matter.

Key words: Multiplication, rooting, acclimatization, in vitro, light.

INTRODUÇÃO

Gypsophila paniculata é uma espécie ornamental, arbustiva e subtropical, da família das Caryophyllaceas, com aproximadamente 1 metro de altura (BARROSO, 1978). Embora seja perene é, normalmente, produzida como planta anual (SHILLO, 1985). No Brasil é chamada comercialmente de "mosquitinho" ou "branquinha", sendo uma importante flor de corte, muito utilizada em arranjos florais, acompanhando outras flores de alto valor comercial, como a rosa (ANON, 1978).

A *Gypsophila* pode ser propagada vegetativamente ou através de sementes. O método usual de propagação no Brasil, é a vegetativa através de estaquia apical. A propagação por sementes torna-se onerosa pois as mesmas são todas importadas. No entanto, esta forma de propagação apresenta algumas dificuldades, pois requer uma boa infraestrutura como casa de vegetação, assepsia no manejo do material vegetativo, além de ser um processo demorado. Estes fatores fazem da propagação *in vitro* uma alternativa vantajosa em relação a propagação tradicional. A micropropagação proporciona uma rápida multiplicação de plantas sadias em maior quantidade, a partir de pouco material vegetativo, independente da época do ano. Além disso, necessita um espaço físico pequeno, permitindo também a obtenção de plantas livres de bactérias, fungos e vírus, que podem afetar o desenvolvimento das plantas (KUSEY *et al.*, 1980; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A maior parte dos trabalhos com propagação de *Gypsophila paniculata* L. publicados, tem utilizado o ágar como agente geleificante do meio de cultura e reguladores de crescimento durante a fase de multiplicação *in vitro* (CASTRO *et al.*, 1996; GRIBBLE *et al.*, 1996). Dentre estes encontram-se o BAP (Benzilaminopurina) e TDZ (Thidiazuron), pertencentes ao grupo das citocininas, e o ANA (Ácido naftalenoacético), uma auxina, em concentrações que variam 1,0 a 6,0 mg.L⁻¹ e 0,0 a 1,0 mg.L⁻¹ respectivamente (AHRONI, *et al.*, 1997 e ZUKER, *et al.*, 1997).

O uso de citocininas em altas concentrações nos meios de multiplicação, no entanto pode induzir a vitrificação ou hiperhidricidade em inúmeras espécies, incluindo as plantas ornamentais (BACHETTINI, 2000), como a *Gypsophila*. No entanto, esta alteração fisiológica pode ocorrer em função de outros fatores, como alta concentração de nutrientes minerais, baixa concentração de ágar e alta umidade relativa no interior dos frascos (DAGUIN & LETOUZÉ, 1986; GRIBBLE *et al.*, 1996). Segundo HAN *et al.*, (1996), a hiperhidricidade pode

também, ser intensificada em função do tipo de material utilizado no fechamento dos frascos de cultura e que brotos vitrificados liberam mais CO₂ e menos etileno em relação aos não vitrificados. Este fenômeno pode afetar a sobrevivência e adaptação das plantas cultivadas *in vitro* após sua transferência para o solo, aumentando sua suscetibilidade à contaminação por fungos e à produtos químicos (REUTHER, 1990; GRIBBLE *et al.*, 1996).

Além dos reguladores de crescimento, a luz também pode influenciar a taxa de multiplicação e o crescimento *in vitro*. Os componentes, comprimento de onda e densidade de fluxo luminoso podem ter efeitos positivos e/ou negativos no cultivo *in vitro* (SEABROOK, 1987; KODYM & ZAPATA-ARIAS, 1999; KOZAI *et al.*, 1991). No caso específico da *Gypsophila* não existe nenhum relato do efeito da luz sobre a taxa de multiplicação e posterior aclimatização das plantas ou brotos cultivados *in vitro*. Em consequência disso, o presente trabalho teve como objetivo verificar a influência da densidade de fluxo luminoso sobre a taxa de multiplicação de microestacas, crescimento dos brotos e percentagem de sobrevivência das plantas após aclimatização das mesmas sob condições controladas.

MATERIAL E MÉTODOS

Multiplicação

Para a fase de multiplicação *in vitro* utilizaram-se explantes constituídos por microestacas contendo duas gemas axilares, retiradas de brotos de *Gypsophila paniculata* L. 'Bristol fairy', propagados *in vitro*. Os explantes foram inoculados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), contendo 30g.L⁻¹ de sacarose, 100mg.L⁻¹ de mio-inositol e 10g.L⁻¹ de ágar, sem reguladores de crescimento. O pH foi ajustado para 5,8, antes da colocação do ágar e da esterilização do meio, realizada por autoclavagem por 20 minutos a 120°C e 1,5 atm. Após a autoclavagem, o meio foi distribuído em frascos com capacidade de 250 mL (30 mL por frasco), os quais foram fechados com filme de polipropileno. Foram utilizados 8 explantes por frasco e 5 frascos por tratamento, totalizando 120 explantes em 15 frascos. Os frascos foram transferidos para câmara de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 23 ± 2 °C e sob diferentes densidades de fluxo luminoso (15,705; 41,88 e 83,76 W.m⁻²), fornecidos por lâmpadas fluorescentes "branca-

fria". A cada 30 dias fez-se repicagem para o mesmo meio de cultura fresco, sob as mesmas condições de cultivo, para obtenção de uma melhor uniformidade do material. Após a terceira repicagem avaliou-se o número e comprimento de brotos e número de entrenós por broto. Também foram observados a coloração e ocorrência de vitrificação.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de 8 explantes. A comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Enraizamento e aclimatização

Brotos com no mínimo 2,0 cm de comprimento, foram utilizados para a fase de enraizamento *ex vitro* e consequente aclimatização dos mesmos. Utilizaram-se 25 brotos de cada densidade de fluxo luminoso, os quais, após lavagem para retirada do meio de cultura aderido, foram tratados pela imersão de suas bases numa solução de 100,0 mg.L⁻¹ de AIB (ácido indolilbutírico), por 3 minutos. Posteriormente, foram plantados em substrato esterilizado, composto de casca de arroz queimada, e transferidos para câmara de crescimento sob 104,70 W.m⁻² de densidade de fluxo luminoso e alta umidade relativa (90%), com cobertura plástica. Após 30 dias foram avaliados a taxa de enraizamento, peso de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular. Para obtenção do peso de matéria seca, os tecidos foram mantidos em estufa por 24 horas a uma temperatura de 70°C.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado com 5 repetições, sendo cada repetição constituída por 5 plantas. A comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Multiplicação

De acordo com a análise de variância, houve diferença significativa apenas para a variável comprimento de brotos. Observou-se que a menor densidade de fluxo luminoso empregada (15,705 W.m⁻²) proporcionou maior comprimento dos brotos (4,66cm), quando comparada com as demais densidades analisadas (Tabela 1), sendo 50% superior aos brotos cultivados sob 41,88 e 83,76 W.m⁻² (2,71 e 2,64 cm, respectivamente).

TABELA 1 - Média das variáveis analisadas na fase de multiplicação de *Gypsophila paniculata* L. nos diferentes tratamentos.

Densidade Fluxo luminoso (W.m ⁻²)	Variáveis		
	Nº brotos	Comprimento brotos (cm)	Nº entrenós
15,705	1,57 a*	4,66 a	6,93 a
41,88	1,55 a	2,71 b	6,10 a
83,76	1,37 a	2,64 b	5,95 a

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey $\alpha= 0,05$

Como não ocorreram diferenças significativas no número de entrenós, nas diferentes densidades de fluxo luminoso (Tabela 1), o maior comprimento dos brotos cultivados sob 15,705 W.m⁻² resultou do aumento de tamanho de seus entrenós.

Observações visuais permitiram verificar que brotos cultivados sob densidade mais baixa de fluxo luminoso apresentavam caules mais finos e flexíveis, enquanto que os cultivados sob 83,76 W.m⁻² mostravam-se mais rígidos e com maior diâmetro de caule. Verificou-se também, que os brotos

desenvolvidos sob densidade de fluxo luminoso mais baixo (15,705 W.m⁻²) apresentavam cor verde brilhante, enquanto que os desenvolvidos em 41,88 e 83,76 W.m⁻² tinham cor verde mais escuro e opaco.

Até meados da década de oitenta, considerava-se que explantes e brotos cultivados *in vitro* tinham baixa capacidade fotossintética para fornecer um balanço positivo de carbono, portanto, necessitavam de carboidratos como fonte de energia (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). Pesquisas recentes, entretanto, têm revelado que explantes/brotos

verdes *in vitro*, em geral, tem alta capacidade para realizar fotossíntese, e que baixas taxas fotossintética líquida e de crescimento são devidas, principalmente as pequenas concentrações de CO₂ no interior dos frascos de cultura, durante o fotoperíodo (KOZAI *et al.*, 1991; KOZAI *et al.*, 1988a;1988b). Portanto, em alguns casos é possível crescer plantas *in vitro* mais rapidamente sob condições fotoautotróficas do que sob condições hetero ou mixotróficas, desde que o ambiente físico no interior dos frascos seja controlado adequadamente para a promoção do processo fotossintético (KOZAI, 1988). Culturas hetero ou mixotróficas são desenvolvidas na presença de açúcares e densidade de fluxo luminoso variando entre 10,47 a 41,88 W.m⁻² e acima de 157,00 W.m⁻², respectivamente (KOZAI *et al.*, 1991). No presente trabalho, os brotos foram submetidos à densidade de fluxo luminoso entre 15,705 e 83,76 W.m⁻², muito similares às utilizadas em culturas heterotróficas, além do meio de cultura ter sido suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose. Assim, o maior crescimento dos brotos sob 15,70 W.m⁻² pode ser o resultado do processo de estiolamento induzido pela luminosidade deficiente, ocasionando maior crescimento dos entrenós e caules mais finos. Além disso, as folhas destes brotos apresentavam coloração verde brilhante, fazendo supor que o aparato fotossintético não tenha se desenvolvido adequadamente. PETERS & MAGALHÃES JR., (1991) trabalhando com pereira, verificaram que intensidades luminosas mais elevadas determinavam, ao contrário do que foi obtido nesta pesquisa, um maior número e comprimento de gemas/brotos. Segundo os autores, essa maior taxa de multiplicação poderia ser explicada por uma interação entre o regime de luz e a auxina endógena. Dentro deste contexto, maior intensidade de luz poderia estar reduzindo a concentração do AIA endógeno das gemas, através da fotoxidação, provocando um deslocamento do balanço hormonal em direção as citocininas, o qual por sua vez, elevaria a taxa de multiplicação. Mas, esta diferença pode também ocorrer em função do genótipo, pois segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998) a necessidade de maior ou menor intensidade luminosa pode variar de acordo com a espécie em estudo.

Não foi observado a ocorrência de brotos vitrificados nos três tratamentos estudados, embora esta espécie apresente altas taxas de vitrificação (até 80% das plantas) sob condições comerciais ou experimentais (GRIBBLE *et al.*, 1996). Este resultado pode ser justificado pela ausência de reguladores de crescimento na fase de multiplicação e também por uma maior concentração de ágar utilizada no meio de cultura (10,0 g.L⁻¹), quantidade acima da normalmente empregada para o cultivo *in vitro* desta espécie (7,0g.L⁻¹) (GRIBBLE, 1999; GRIBBLE *et al.*, 1996; TURNER & SHINGA, 1990). LEITE *et al.*, (1993) também verificaram que concentrações de 10 e 12 g.L⁻¹ de ágar no meio de multiplicação, reduzem a taxa de vitrificação de brotos de pereira.

Através de observações visuais, KOZAI *et al.*, (1991) verificaram que brotos de morangueiro cultivados sob condições autotróficas não apresentavam vitrificação e eram mais vigorosos que aqueles desenvolvidos sob condições mixotróficas.

Outro fator que pode ter evitado a vitrificação, foi o uso do filme de polipropileno transparente para vedar os frascos, pois este tipo de material, além de proporcionar maior penetração de luz em comparação com outros tipos de tampas, possibilita perdas de água mais rápidas para o ambiente, aumentando a taxa de transpiração dos brotos ou plantas *in vitro* (KOZAI *et al.*, 1991). GRIBBLE (1999) verificou que plantas de *Gypsophila paniculata* L. cultivadas *in vitro* sob alta disponibilidade hídrica e baixa umidade relativa no interior dos frascos, desenvolviam-se normalmente e tinham supostamente maiores taxas de transpiração que plantas cultivadas sob alta umidade relativa. Este autor sugere que a carência de transpiração talvez seja mais importante na indução da vitrificação que a alta disponibilidade hídrica no meio de cultura (DEBERGH, 1983).

Enraizamento e aclimatização

Todos os brotos transferidos para substrato *ex vitro*, independente da densidade de fluxo luminoso a que foram submetidos durante a fase de multiplicação, enraizaram (100%). Observou-se no entanto, de acordo com a análise de variância, que ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos quanto a matéria fresca e seca, tanto para a parte aérea como para o sistema radicular das plantas após 30 dias de transferência das condições *in vitro* para *ex vitro* (Tabelas 2 e 3). A alta taxa de enraizamento das plantas estudadas, pode ser justificada pelo fato de que espécies herbáceas apresentam uma grande capacidade de enraizamento de estacas, quando uma planta passa de um estado de alta disponibilidade nutricional (*in vitro*) para uma condição autotrófica (*ex vitro*) (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Outro fator que pode estar associado a resposta de 100% de enraizamento, é a qualidade dos brotos, que não apresentavam sinais de vitrificação, pois existe uma relação inversa entre o grau desta desordem fisiológica e a sobrevivência das plantas *ex vitro* (GRIBBLE, 1999).

Plantas oriundas de 41,88 e 83,76 W.m⁻² apresentaram maior peso de matéria fresca e seca que as provenientes de 15,705 W.m⁻², evidenciando que as plantas formadas de brotos multiplicados sob regimes de luz com maior densidade de fluxo luminoso, eram mais vigorosas que as cultivadas sob 15,705 W.m⁻² (Figura 1). Segundo KOZAI *et al.*, (1991) brotos ou plantas de morangueiro cultivadas sob condições fotoautotróficas, ou seja, sob altas densidade de fluxo luminoso, além de serem mais vigorosas, seriam mais facilmente aclimatizadas, visto que estariam sujeitas a menores alterações no ambiente físico, fisiológico e nutricional, quando da transferência da condição *in vitro* para *ex vitro*. Esta premissa também foi confirmada por SEON *et al.*, (1999), trabalhando com *Rehmannia glutinosa*.

TABELA 2 - Peso de matéria fresca e peso de matéria seca da parte aérea de plantas de *Gypsophila paniculata* L. após enraizamento *ex vitro* e aclimatização.

Densidade Fluxo luminoso (W.m ⁻²)	Variáveis	
	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
15,705	0,35 b*	0,19 b
41,88	0,94 a	0,36 a
83,76	0,91 a	0,35 a

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey $\alpha=0,05$

TABELA 3- Peso de matéria fresca e peso de matéria seca do sistema radicular de plantas de *Gypsophila paniculata* após o enraizamento *ex vitro* e aclimatização.

Densidade Fluxo luminoso ($W.m^{-2}$)	Variáveis	
	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
15,705	0,04 b	0,018 b
41,88	0,06 ab	0,031 ab
83,76	0,07 a	0,046 a

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey $\alpha= 0,05$

A

B

C

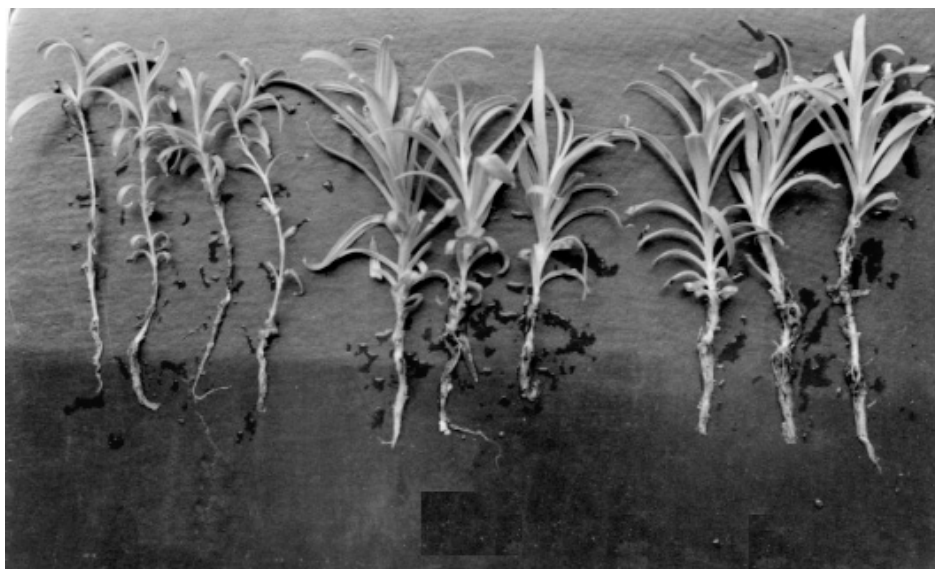


Figura 1 - Plantas de *Gypsophila paniculata* L., oriundas de brotos cultivados sob três densidades de fluxo luminoso (A= 10,705; B= 41,88; C= 83,6 $W.m^{-2}$) após enraizamento e aclimatização.

A formação de raízes adventícias é uma etapa chave na micropropagação. Um eficiente sistema de enraizamento deve apresentar alta percentagem de brotos enraizados e sistema radicular de alta qualidade. O desenvolvimento de um bom sistema radicular está relacionado a formação de um número e comprimento de raízes adequados e a ausência da formação de calo, além de determinar boa performance após o plantio para o solo (DE KLERK *et al.*, 1997, MOHAMMED & VIDAVER, 1990). Dos dois processos de enraizamento (*in vitro* e *ex vitro*), normalmente empregados em microestacas (DE KLERK *et al.*, 1997), o enraizamento *ex vitro* melhora a qualidade do sistema radicular, além de otimizar o processo de micropropagação. Em termos de qualidade, a regeneração de raízes diretamente no substrato tende a produzir um sistema radicular mais completo e funcional, com maior número de raízes secundárias e sem a formação de calo o que dificultaria a conexão do sistema vascular entre caule e raiz. Além disso, evita-se a manipulação de plantas com raiz nua ou a poda de raízes, práticas que muitas vezes resultam em má qualidade do transplante e até na morte das plantas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Do ponto de vista econômico, a eliminação desta fase *in vitro*, determina uma redução considerável nos custos de mão-de-obra e infraestrutura, pois ao eliminar uma repicagem, economiza-se o espaço físico na sala de crescimento, energia elétrica e o uso de meios de cultura. Neste trabalho, a imersão da base das microestacas numa solução de 100 $mg.L^{-1}$ de AIB e o plantio das mesmas em substrato constituído por casca de arroz queimado, além de induzir 100% de enraizamento, proporcionou a formação de um sistema radicular adequado, sem indução de calos e com presença de raízes secundárias (Figura 1). Estes resultados, aliados a inexistência de vitrificação durante a fase de multiplicação, demonstram a

eficiência do protocolo empregado nesta pesquisa, podendo o mesmo ser empregado no processo de micropropagação comercial desta espécie.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- Densidades de fluxo luminoso mais elevadas produzem brotos menores, com caules mais rígidos e com maior diâmetro;
- A ausência de reguladores de crescimento e a adição de 10 $g.L^{-1}$ de ágar no meio de multiplicação possibilita a produção de brotos de alta qualidade, sem o desenvolvimento de distúrbios fisiológicos, como a vitrificação dos mesmos;
- O tratamento da base dos brotos com solução de AIB (100,0 $mg.L^{-1}$), aliado a qualidade dos mesmos, induz alta taxa de enraizamento *ex vitro* e aclimatização;
- A densidade de fluxo luminoso, durante a fase de multiplicação, não afeta a taxa de enraizamento dos brotos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHRONI, A.; ZUKER, A.; ROZEN, Y.; SHEJTMAN, H.; VAINSTEIN, A. An efficient method for adventitious shoot regeneration from stem-segment explants of *Gypsophila paniculata*. **Plant cell, Tissue and organ culture**, v. 49, p. 101-106, 1997.
- ANON, *Gypsophila* clean-up. **Grower**, v.90, n.18, p.869, 1978.
- BACHETTINI, P.S.V. **Micropropagação de *Gypsophila paniculata* L.** Pelotas, 2000. 45p. Dissertação (mestrado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Pelotas.

- BARROSO, G. M. **Família Caryophyllaceae Lindl**, sistemática dos angiospermas do Brasil. São Paulo, EDUSP, 1978. p. 103-108.
- CASTRO, V.M.; DARDEL, H.C.; VERDUGO, R.G. Propagación *in vitro* de *Gypsophila paniculata* L. **Agricultura Técnica**, v. 56, p. 224-228, 1996.
- DAGUIN, F.; LETOUZÉ, R. Ammonium-induced vitrification in cultured tissues. **Physiology Plant**, v. 66, p. 94-98, 1986.
- DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, v. 59, p. 270-276, 1983.
- DE KLERK, G.J.; BRUGGE, J.T.; MARINOVA, S. Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus* "Jork 9". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 39-44, 1997.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture. **Exetetics Ltd.**, England, p. 223-227, 1984.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, 1998. p.183-260.
- GRIBBLE, K.; SARAFIS, V.; NAILON, J.; HOLFORD, P.; UWINS, P. Environmental scanning electron microscopy of the surface of normal and vitrified leaves of *Gypsophila paniculata* (Babies Breath) cultured *in vitro*. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 771-776, 1996.
- GRIBBLE, K. The influence of relative humidity on vitrification, growth and morphology of *Gypsophila paniculata* L. **Plant Growth Regulation**, v. 27, p. 179-188, 1999.
- HAN, B.; YOUNG, H.Y.; CHOI, J.; PAEK, K.Y.; HAN, B.H., JOUNG, H.Y.; CHOI, J.; PAEK, K.Y. Effect of different sealing materials on CO₂ and ethylene concentration in culture vessel, and growth and vitrification of *Gypsophila paniculata* "Bristol Fairy". **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, v. 37, p. 118-122, 1996.
- KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. "Grande Naine"). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 55, p. 141-145, 1999.
- KOZAI, T. Autotrophic (sugar-free) tissue culture for promoting the growth of plantlets *in vitro* and reducing biological contamination. **Proc. of International Symposium on Application of Biotechnology for Small Industries in developing countries**, Bangkok, p. 39-51, 1988.
- KOZAI, T.; KOYAMA, Y.; WATANABE, I. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar-free medium under high photosynthetic photon flux. **Acta Horticulture**, v. 230, p. 121-127, 1988a.
- KOZAI, T.; KUBOTA, C.; WATANABE, I. Effects of basal medium composition on the growth of carnation plantlets in auto-and mixotrophic tissue culture. **Acta horticulture**, v. 230, p. 159-166, 1988b.
- KOZAI, T.; IWABUCHI, K.; WATANABE, K.; WATANABE, I. Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 25, p. 107-115, 1991.
- KUSEY, W. E.; HAMMER, A. and WEILER, T. C. *In vitro* propagation of *Gypsophila paniculata* L. **HortScience**, v.15, n.5, p. 600-601, 1980.
- LEITE, D.L.; PETERS, J.A.; NAKASU, B.H. Efeito de solidificantes sobre a multiplicação e crescimento de gemas de pereira. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, p. 47-49, 1993.
- MOHAMMED, G.H.; VIDAVER, W.E. The influence of acclimatization treatment and plantlet morphology on early greenhouse performance of tissue-cultured Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 21, p. 111-117, 1990.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biomassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- PETERS, J.A.; MAGALHÃES Jr., A. Efeito do meio de cultura, tipo de lâmpada e intensidade de luz na multiplicação *in vitro* de ameixeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 13, p. 41-48, 1991.
- REUTHER, G. Stimulation of the photoautotrophy of *in vitro* plants. In: International Horticultural Congress, Firenze, 1990. **Abstracts...** Firenze: 1990.
- SEABROOK, J.E.A. Changing the growth and morphology of potato plantlets *in vitro* by varying the illumination source. **Acta Horticulture**, v. 212, p. 4010410, 1987.
- SEON, J.H.; CUI, C.H.; PAEK, K.Y.; YANG, C.S.; GAO, W.Y.; PARK, C.H.; SUNG, S.N. Effects of air exchange, sucrose, and PPF on growth of *Rehmannia glutinosa* under enriched CO₂ concentration *in vitro*. **Acta Horticulture**, v. 502, p. 313-318, 1999.
- SHILLO, R. *Gypsophila paniculata* In: HALEVY, A.H. (ed.) Hand-book of flowering. Florida: CRC e Boca Raton, 1985, v. 3, p. 83-87.
- TURNER, S.R.; SINGA, S. Vitrification of crabapple, pear and geum on gellan gum-solidified culture medium. **Hortscience**, v. 12, p. 1648-1650, 1990.
- ZUKER, A.; AHRONI, A.; SHEJTMAN, H.; VAINSTEIN, A. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of *Gypsophila paniculata* L. **Plant cell Reports**. v. 16, p. 775-778, 1997.