

ISSN 1808-9909  
Volume 2, Número 1, 2006

# PLANT CELL CULTURE & MICROPROPAGATION



## Cultura de Células & Micropropagação de Plantas

Publicação Científica da Associação Brasileira  
de Cultura de Tecidos de Plantas

Plant Cell Cult. Micropropag., Lavras, MG, v. 2, n. 1, p. 1-52, 2006

A revista “**Plant Cell Culture & Micropropagation**”, editada semestralmente pela Editora da Universidade Federal de Lavras (Editora UFLA), publica artigos científicos da área de cultura de tecidos de plantas por membros da comunidade científica nacional e internacional. Com uma tiragem de 600 exemplares é distribuída aos membros da **ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS (ABCTP)** em dia com a anuidade.

**Para se associar à ABCTP consulte o site: <[www.abctp.ufla.br](http://www.abctp.ufla.br)>**

### **PERMUTA**

A revista “**Plant Cell Culture & Micropropagation**” deseja fazer permuta com revistas de áreas afins.

### **ABCTP**

**Universidade Federal de Lavras - Departamento de Biologia  
Setor de Fisiologia Vegetal - Caixa Postal: 3037 - Lavras – MG - CEP 37200-000**

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Plant Cell Culture & Micropropagation = Cultura de Células &  
Micropropagação de Plantas. – v. 1, n. 1 (jan./jun. 2005)- . –  
Lavras : Ed. UFLA, 2005-  
v. il.

Semestral (junho e dezembro).  
Publicação Científica da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos  
de Plantas (ABCTP).  
ISSN 1808-9909

1. Cultura de Tecidos de Plantas. I. Associação Brasileira de Cultura  
de Tecidos de Plantas. II. Universidade Federal de Lavras. Departamen-  
to de Biologia. Setor de Fisiologia Vegetal.

CDD (22ª ed.) 580.72405

#### **INDEXADO por:**

AGRIS  
AGROBASE



## **DIRETORIA**

**Presidente** – Renato Paiva – UFLA

**Secretário** – Moacir Pasqual – UFLA

**Secretário Adjunto** – Antônio Carlos Torres – EMBRAPA Hortaliças

**Tesoureiro** – Guilherme Augusto Canella Gomes – Bengel do Brasil

## **COMISSÃO EDITORIAL**

### **EDITOR CHEFE**

Renato Paiva – UFLA

### **CONSELHO EDITORIAL**

Antônio Carlos Torres – EMBRAPA Hortaliças

Moacir Pasqual – UFLA

Renato Paiva – UFLA

### **BIBLIOGRAFIA**

Márcio Barbosa de Assis - UNILAVRAS

### **NOMENCLATURA CIENTÍFICA**

Manuel Losada Gavilanes – UFLA

### **EDITORAÇÃO**

Christyane Aparecida Caetano – Editora UFLA

Alézia Conceição Modesto Ribeiro – Editora UFLA

Luciana Carvalho Costa – Editora UFLA

## **SECRETARIA**

Cristiano Martinotto – UFLA

## **EDITORES ASSOCIADOS**

Enio Luiz Pedrotti - UFSC

Francisco de Assis Paiva Campos - UFC

Gilberto Barbante Kerbauy - USP

João Batista Teixeira - EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Antônio Peters - UFPEL

Kasumitsu Matsumoto- EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia

Lilia Gomes Willadino - UFRPE

Linda Styer Caldas - UNB

Luciana Ribas - UFPR

Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa - UFRN

Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin- UFPR

Miguel Pedro Guerra - UFSC

Miklos Gábor Fári – Universidade de Debrecen – Ungria

Otto Jesu Crocomo – ESALQ - USP

Renato de Oliveira Resende - UNB

Schuyler Korban – Universidade de Illinois - Estados Unidos

Silvio Lopes Teixeira - UENF

Terezinha Rangel Camara – UFRPE

Wagner Aparecido Vendrame – Universidade da Flórida – Estados Unidos

Wagner Campos Otoni – UFV

## **CONSULTORIA CIENTÍFICA (Vol. 2, N.1)**

Alexandre Hoffmann – EMBRAPA Uva e Vinho

Aloisio Xavier - UFV

Amauri Alves de Alvarenga - UFLA

Antonio Chalfun Junior - UFLA

Eurico Eduardo Pinto de Lemos - UFAL

Jose Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA

José Ranier e Ferreira de Santana - UEFS

Leonardo Ferreira Dutra – EMBRAPA Florestas

Lilia Gomes Willadino - UFRPE

Luiz Antonio Biasi - UFPR

Marcelo Murad Magalhães - UFLA

Miguel Pedro Guerra - UFSC

Osmar Alves Lameira – EMBRAPA Amazônia Oriental

Silvio Lopes Teixeira - UENF

Wagner Campos Otoni - UFV

# Plant Cell Culture & Micropropagation

## CONTEÚDO

<b>01. Acúmulo de solutos orgânicos em genótipos de bananeira (<i>Musa</i> spp.) sob estresse salino <i>in vitro</i>.</b> Accumulation of organic solutes in banana ( <i>Musa</i> spp) genotypes under saline stress <i>in vitro</i> . Josabete Salgueiro Bezerra de Carvalho, Lília Gomes Willadino, Terezinha Rangel Camara, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Rejane Jurema Mansur Custódio Nogueira .....	1
<b>02. Avaliação de diferentes formulações de sais minerais para a micropropagação de <i>Nidularium fulgens</i> Lam.</b> Evaluation of different concentrations of MS and Knudson media for micropropagation of <i>Nidularium fulgens</i> Lam. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, Vanessa Coelho Naves, Renato Paiva, Moacir Pasqual .....	9
<b>03. Efeito de substratos na germinação <i>in vitro</i> de mogno (<i>Swietenia macrophylla</i> King).</b> Effect of substrates for <i>in vitro</i> germination of mahogany ( <i>Swietenia macrophylla</i> King). Osmar Alves Lameira, Sebastião da Cunha Lopes, Noemi Vianna Martins Leão, Iracema Maria Castro Coimbra Cordeiro, Lana Roberta Sousa Reis .....	15
<b>04. Growth regulators pulsing pre-treatment effect on the <i>Eucalyptus grandis</i> shoot and adventitious root morphogenesis.</b> Efeito do pré-tratamento com pulsos de reguladores de crescimento na morfogênese de brotações e raízes adventícias de <i>Eucalyptus grandis</i> . Edgard Augusto de Toledo Picoli, Acelino Couto Alfenas, Robson Maia Geraldine, Letícia de Almeida Gonçalves, Wagner Campos Otoni, Leonardo Lucas Carnevalli Dias, Daniela Andrade Neves, Shinitiro Oda .....	20
<b>05. Multiplicação <i>in vitro</i> do porta-enxerto de videira Paulsen 1103 com benzilaminopurina e ácido indolbutírico.</b> Multiplication of Paulsen 1103 grapevine rootstock <i>in vitro</i> with benzylamimopurine and indolacetic acid. Marco Antônio Karam Lucas, Norton Victor Sampaio, Denise Dias Pereira, Tanira Gimenez Sampaio, Giovâni Silveira Peres, Joelma Dutra Fagundes .....	29
<b>06. Avaliação da consistência do meio de cultura na propagação <i>in vitro</i> de capim-elefante (<i>Pennisetum purpureum</i> Schum.).</b> Evaluation of culture medium consistencies on proliferation of <i>in vitro</i> propagated elephantgrass ( <i>Pennisetum purpureum</i> Schum.). Marines Marli Gniech Karasawa , José Cardoso Pinto , Antônio Vander Pereira , José Eduardo Brasil Pereira Pinto .....	35
<b>07. Efeito do meio de cultura e concentrações de auxinas no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>Prunus cerasifera</i> CV. Mr. S. 1/8.</b> Effect of culture media and concentrations of auxines in shooting <i>in vitro</i> of <i>Prunus cerasifera</i> L. CV. Mr. S. 1/8. Anderson da Costa Chaves, Márcia Wulff Schuch , Alan Cristiano Erig .....	43
<b>08. Efeito do tipo de incisão sobre a dominância apical em ápices caulinares em duas cultivares de bananeira (<i>Musa</i> sp.).</b> Effect of shoot tip cuttings on apical dominance of two banana ( <i>Musa</i> sp.) cultivars. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, Alexandra Maria Gomes Costa, Maurício Reginaldo Alves dos Santos .....	48



# ACÚMULO DE SOLUTOS ORGÂNICOS EM GENÓTIPOS DE BANANEIRA (*Musa spp.*) SOB ESTRESSE SALINO *IN VITRO*

## ACCUMULATION OF ORGANIC SOLUTES IN BANANA (*Musa SPP*) GENOTYPES UNDER SALINE STRESS *IN VITRO*

JOSABETE SALGUEIRO BEZERRA DE CARVALHO<sup>1</sup>, LÍLIA GOMES WILLADINO<sup>2</sup>, TEREZINHA RANGEL CAMARA<sup>3</sup>, ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO<sup>4</sup>, REJANE JUREMA MANSUR CUSTÓDIO NOGUEIRA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Botânica – Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE – R. Dom Manoel de Medeiros, s/n – 52171-900 – Recife, PE.

<sup>2</sup>Dra. Departamento de Biologia – Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE – R. Dom Manoel de Medeiros, s/n – 52171-900 – Recife, PE – Brasil – lilia@truenet.com.br

<sup>3</sup>Dra. Departamento de Química – Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE – R. Dom Manoel de Medeiros, s/n – 52171-900 – Recife, PE.

<sup>4</sup>Dra. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE – R. Dom Manoel de Medeiros, s/n – 52171-900 – Recife, PE.

### RESUMO

A agricultura irrigada em climas áridos e semi-áridos, frequentemente, conduz à salinização do solo, induzindo um estresse que resulta em alterações nas respostas metabólicas das plantas, entre as quais destaca-se o acúmulo de solutos orgânicos compatíveis. Com este trabalho objetivou-se avaliar o efeito do cloreto de sódio (NaCl) sobre o crescimento e o acúmulo de prolina, proteínas e açúcares solúveis totais em genótipos de bananeira cultivados *in vitro*. A indução do estresse salino foi feita em plantas dos genótipos triploides Nanicão (grupo genômico AAA, subgrupo Cavendish) e Pacovan (grupo genômico AAB, subgrupo Prata) e dos genótipos diplóides, IAC (grupo genômico AB), Calcuttá-4, Microcarpa, Borneo, Jaribuaia e S/N.2 (grupo genômico AA), cultivados *in vitro* em meio MS suplementado com 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina) e submetidos a diferentes concentrações de cloreto de sódio (0 ; 40 ; 60 e 80 mM) durante 60 dias. A menor redução no crescimento foi observada para a cultivar Pacovan, que também apresentou a maior concentração de açúcares solúveis totais e baixo acúmulo de prolina em relação ao controle. Por outro lado, os genótipos que mais acumularam prolina, IAC-AB e Jaribuaia, acumularam mais prolina que os demais e estão entre os que apresentaram as maiores reduções de crescimento. Pelos resultados, observa-se que os açúcares solúveis possuem um papel mais importante do que a prolina na adaptação de plantas de bananeira, cultivadas *in vitro* sob estresse salino.

**Termos para indexação:** Salinidade, prolina, açúcares solúveis totais, proteínas, *Musa*.

### ABSTRACT

Irrigated agriculture in arid and semi-arid zones frequently leads to saline problems in the soil and this stress causes alterations in the metabolism of the plant with particular emphasis on the accumulation of compatible organic solutes. The objective of this work was to evaluate the effect of sodium chloride (NaCl) on growth and accumulation of proline, proteins and total soluble

sugars in banana genotypes cultivated *in vitro*. Saline stress was induced in plants of genotypes triploids Nanicão (AAA-Cavendish subgroup) and Pacovan (AAB-Prata subgroup) and diploids, IAC (AB), Calcuttá-4, Microcarpa, Borneo, Jaribuaia and S/N.2 (AA), cultivated *in vitro* in MS medium supplemented with 2 mg L<sup>-1</sup> BAP (6-benzilaminopurine) and subjected to different concentrations of sodium chloride (0; 40; 60 and 80 mM) during 60 days. The lowest reduction in the growth was observed in the Pacovan triploid (AAB), which also presented the greatest accumulation of total soluble sugars and low proline accumulation in relation to the control. The genotypes IAC-AB and Jaribuaia accumulated higher proline than the others and they are in the group that presented high growth reduction. These results suggest that total soluble sugars play a higher important role than proline accumulation in the adaptation of banana plants cultivated *in vitro* under saline stress.

**Index terms:** Salinity, proline, total soluble sugars, proteins, *Musa*.

### INTRODUÇÃO

A bananeira (*Musa spp.*) é uma das culturas mais exploradas no mundo e, entre as fruteiras, assume importância fundamental por seu valor econômico e social. No Brasil, a produção anual atinge, aproximadamente, 6,4 milhões de toneladas (FAO, 2003), sendo a Região Nordeste responsável por 30,65 % dessa produção (IBGE, 2001).

O cultivo da bananeira é uma das principais atividades agrícolas nos perímetros irrigados do Nordeste, onde o uso inadequado da água de irrigação, associado à ineficiente drenagem do solo, têm provocado problemas de salinização.

(Recebido em 23 de março de 2004 e aprovado em 18 de abril de 2005)

Os efeitos adversos da salinidade sobre as plantas devem-se, principalmente, à redução do potencial osmótico do solo e à toxidez resultante da alta concentração salina, especialmente de íons específicos como o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$  (ROY et al., 1993). Em geral, as plantas glicófitas, quando submetidas ao estresse salino, são capazes de aumentar as concentrações de determinados compostos orgânicos osmoticamente ativos, como prolina, glicinabetaína, açúcares solúveis, entre outros. Esses solutos, que se acumulam principalmente no citoplasma, contribuem para o ajustamento osmótico, protegem estruturas e funções celulares e constituem uma fonte de energia metabólica (SERRANO & GAXIOLA, 1994). O acúmulo de prolina em condições de estresse salino já foi relatado em diversas espécies, tais como tomate, caju, arroz, milho e milho (CAMARA et al., 2000; DAS et al., 1990; LUTTS et al., 1999; PÉREZ-ALFOCEA et al., 1994; VIÉGAS et al., 1999). O papel do acúmulo de prolina no ajuste osmótico e na tolerância à salinidade é ainda bastante controverso. Enquanto alguns autores relatam correlação positiva entre o acúmulo de prolina e a tolerância ao estresse (CAMARA et al., 2000; KUMAR et al., 2003; VIÉGAS et al., 1999), outros consideram que o acúmulo de prolina é um mero sintoma do estresse (DAS et al., 1990; LUTTS et al., 1999; PÉREZ-ALFOCEA et al., 1994). Os açúcares solúveis, por sua vez, vêm se destacando como solutos orgânicos osmoticamente ativos (LACERDA et al., 2001; LUTTS et al., 1999), sobretudo a sacarose, o manitol, o pinitol e o sorbitol (WILLADINO & CAMARA, 2004).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar as variações nos teores endógenos de prolina, proteínas solúveis e açúcares solúveis totais, visando a identificar seu papel na tolerância de genótipos comerciais e diplóides de bananeira submetidos ao estresse salino em condições *in vitro*.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados oito genótipos de bananeira: duas cultivares comerciais: Nanicão (grupo genômico AAA, subgrupo Cavendish) e Pacovan (grupo genômico AAB,

subgrupo Prata) e; os genótipos diplóides: IAC (grupo genômico AB), Calcuttá-4, Microcarpa, Borneo, Jaribuia e S/N.2 (genótipos do grupo genômico AA), fornecidos pelo Banco Ativo de Germoplasma do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMP/EMBRAPA). Os genótipos Pacovan e Calcuttá foram utilizados como contrastantes no que se refere à maior e à menor tolerância à salinidade, respectivamente (GOMES et al., 2002).

Foram utilizados ápices caulinares, previamente estabelecidos e repicados *in vitro* durante três subcultivos, de 30 dias cada um. Os ápices foram cultivados individualmente em tubos de ensaio (15,0 cm de comprimento e 2,0 cm de diâmetro, fechados com tampas da Sigma®) contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e acrescido de NaCl (0 ; 40 ; 60 e 80 mM). O meio foi solidificado com  $6,0 \text{ g L}^{-1}$  de ágar (Merck®) e o pH, ajustado para 5,8. As plantas provenientes dos ápices caulinares foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, utilizando-se luz branca fria, com intensidade luminosa de  $56 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , durante 60 dias.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial  $8 \times 4$ , correspondendo a oito genótipos de bananeira e quatro níveis de NaCl. Foram utilizados três blocos com 320 parcelas. A unidade experimental foi representada por uma planta em cada tubo de ensaio.

Após 60 dias, foram avaliados a altura das plantas, os sintomas visuais do estresse salino e os teores de prolina livre, proteínas solúveis totais e açúcares solúveis totais. Para a determinação dos solutos orgânicos, foram realizadas cinco leituras por tratamento.

Para a determinação do teor de prolina livre, amostras de 250 mg de folhas frescas foram homogeneizadas manualmente em almofariz, com 5 mL de ácido sulfossalicílico a 3% e filtradas em papel de filtro Whatman nº 2. Em tubo de ensaio contendo 1 mL do extrato sulfossalicílico, foram adicionados 1 mL de ninidrina ácida



e 1 mL de ácido acético glacial. Em seguida, os extratos foram mantidos durante 1 hora em banho-maria a 100 °C e, após resfriamento por imersão em banho de gelo, foram adicionados 2 mL de tolueno, agitando-se vigorosamente. A fração colorida foi lida em espectrofotômetro a 520 nm, usando tolueno como branco (BATES, 1973). Foi utilizada uma curva-padrão de prolina.

Para determinação dos teores de proteínas solúveis totais e açúcares solúveis totais, pesaram-se 200 mg de matéria fresca, homogeneizando-se manualmente com 10 mL de etanol a 70%. Em seguida, as amostras foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 2 e os pigmentos, removidos com clorofórmio. Para análise de proteínas, utilizaram-se 0,1 mL da fase aquosa, 2,0 mL do reagente azul de coomassie e a leitura em absorbância a 595 nm (BRADFORD, 1976). As absorbâncias obtidas foram comparadas com uma curva-padrão preparada com albumina de soro bovino (BSA).

Na análise de açúcares solúveis totais, diluiu-se 0,2 mL do extrato aquoso em 2,0 mL de água destilada, e procedeu-se à reação de 0,2 mL do extrato com 1,0 mL do reagente antrona. Em seguida, as amostras foram mantidas em banho-maria por 10 minutos a 100° C e depois submetidas a uma rápida imersão em banho de gelo. A leitura foi feita a 620 nm e utilizou-se uma curva padrão de glicose (YEMM & WILL, 1954).

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA), com o software SANEST (ZONTA & MACHADO, 1984). A comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e análise de correlação linear para as variáveis proteína e prolina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aos 60 dias de cultivo, as plantas apresentavam-se bastante danificadas em todos os tratamentos com NaCl; os sintomas evoluíram para queima e necrose do limbo, a qual teve início nas margens laterais e no ápice em direção à nervura principal. Essa sintomatologia foi mais acentuada

nos genótipos Nanicão e Calcuttá do que em Pacovan. Em trabalho anterior, realizado em casa-de-vegetação, constatou-se que genótipos de bananeira mais sensíveis ao NaCl, como o Calcuttá, apresentaram maior área com queima e necrose foliar e que essa sintomatologia está diretamente correlacionada com o acúmulo de Na<sup>+</sup> nas folhas (GOMES et al., 2002). No referido trabalho, a cultivar Pacovan também demonstrou maior tolerância à salinidade e menor acúmulo de Na<sup>+</sup>. A utilização do cultivo *in vitro* é importante tanto para estudos de mecanismos de tolerância, na planta inteira, bem como para acelerar o processo de pré-seleção, visando à tolerância à salinidade, como foi observado no cultivo *in vitro* de *Agrostis palustris* Huds (KUO et al., 1994).

Para os diplóides Jaribuuaia, Microcarpa, Borneo S/N.2 e Pacovan, o NaCl não inibiu a formação das raízes. Já a cultivar Nanicão e os diplóides Calcuttá e IAC-AB apresentaram redução do sistema radicular a partir do cultivo a 60 mM de NaCl (dados não mostrados). Ulisses et al. (2000), trabalhando *in vitro* com a cultivar Nanicão, submetida a longos períodos sob estresse salino, observaram que apenas 40% das plantas provenientes de 20 mM de NaCl enraizaram, apresentando um sistema radicular constituído por raízes curtas e grossas.

O estresse salino reduziu o crescimento em altura de todos os genótipos estudados (Tabela 1), sendo essa redução proporcional ao aumento da concentração de NaCl. Yano-Melo et al. (2003), estudando plantas de bananeira sob estresse salino, também registraram que seu aumento provocou redução no crescimento. Entre os genótipos, os maiores percentuais de redução de crescimento em relação ao controle foram registrados nos diplóides Borneo (81,1 %) e IAC-AB (80,5 %), quando cultivados a 80 mM de NaCl. Por outro lado, a cultivar Pacovan e o diplóide S/N.2 apresentaram as menores taxas de redução de crescimento (27,9% e 31,6 %, respectivamente) para esse mesmo nível de NaCl. A cultivar Pacovan foi o único genótipo que, aos 40 mM de NaCl, não apresentou redução do crescimento.

**TABELA 1** – Altura e percentual de redução no crescimento em altura dos genótipos de bananeira aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de NaCl. UFRPE, Recife, 2002.

Genótipos	NaCl (mM)							
	0		40		60		80	
	Altura (cm)		Altura (cm)	%	Altura (cm)	%	Altura (cm)	%
Pacovan	1,47 Af		1,47 Ac	0,0	1,29 Bcd	12,3	1,06 Bbc	27,9
S/N.2	3,32 Aa		3,09 Aa	7,0	2,68 Ba	19,3	2,27 Ca	31,6
Nanicão	1,41 Af		1,36 Ac	3,5	1,04 ABd	26,2	0,77 Bc	35,4
Calcuttá-4	1,77 Ae		1,27 Bc	28,2	1,00 BCd	43,5	0,91 Cbc	48,6
Microcarpa	2,23 Acd		1,77 Bb	20,6	1,50 Bbc	32,7	1,09 Cbc	51,1
Jaribuaiá	2,73 Ab		2,09 Bb	23,4	1,63 Cb	40,3	1,23 Db	55,0
IAC-AB	1,18 Af		0,72 Bd	39,0	0,54 Be	54,2	0,23 Cd	80,5
Borneo	1,91 Ade		1,86 Ab	2,6	1,27 Bcd	33,5	0,36 Cd	81,1

Médias na coluna seguidas da mesma letra minúscula ou, na linha seguidas da mesma letra maiúscula, não apresentam diferenças significativa, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A redução no crescimento é, entre outros fatores, um reflexo da redução do alongamento celular, que ocorre em razão da menor disponibilidade de água para as plantas, devido à diminuição do potencial osmótico provocada pelo acúmulo de sais no substrato. A planta, para absorver água e minimizar os efeitos tóxicos do NaCl, ativa mecanismos de acumulação de solutos compatíveis no citoplasma e, dessa forma, promove diminuição do potencial osmótico, favorecendo a absorção de água.

O incremento dos teores de açúcares solúveis foi superior ao de prolina para todos os genótipos (Tabela 2). Outros autores relataram incrementos no conteúdo de carboidratos solúveis superiores ao de prolina em sorgo (LACERDA et al., 2001) e em arroz (LUTTS et al., 1999) e ressaltaram que o acúmulo de açúcares solúveis apresenta-se como um mecanismo fundamental para o ajustamento osmótico sob condições de estresse salino.

A maior concentração de açúcares solúveis em relação ao controle, observado na cultivar Pacovan (Tabelas 2 e 3), coincidiu com a menor redução no crescimento (28 %) e também com a menor

sintomatologia do estresse salino. Smirnoff (1998) destaca que quando o acúmulo do soluto compatível favorece o crescimento das plantas durante o estresse osmótico, evidencia-se a ocorrência de ajustamento osmótico. Lacerda et al. (2001), estudando a tolerância à salinidade em genótipos de sorgo, comentam que os mais tolerantes foram os que mais acumularam açúcares para o ajustamento osmótico, mantendo, dessa forma, condições adequadas para o crescimento. Lutts et al. (1999) também verificaram que as cultivares de arroz mais tolerantes foram as que mais acumularam carboidratos.

Observou-se tendência de incremento nos teores de açúcares solúveis (Tabela 3), prolina (Tabela 4) e proteínas (Tabela 5), para a maioria dos genótipos, em razão do aumento da concentração de NaCl.

Analisando os teores de prolina, os genótipos que mais acumularam esse aminoácido foram os que menos acumularam açúcares (Tabela 2). Entre eles, destacam-se IAC-AB e Jaribuaiá, os quais enquadram-se no grupo de genótipos que apresentou as maiores reduções de crescimento.

**TABELA 2** – Percentual de acumulação de solutos orgânicos, em relação ao controle, em genótipos de bananeira cultivados *in vitro* com 80 mM de NaCl, durante 60 dias. UFRPE, Recife, 2002.

Genótipos	Açúcares solúveis	Prolina	Proteínas solúveis
	.....%.....		
Pacovan	122,74 a	7,90 c	40,90 c
S/N.2	50,00 d	0,0 d	21,06 d
Nanicão	53,40 d	0,0 d	2,29 e
Calcuttá-4 (AA)	74,00 c	5,60 c	85,70 b
Microcarpa	121,60 a	15,61 bc	0,0 e
Jaribuaia	25,35 e	38,90 a	68,84 b
IAC-AB	49,99 d	38,50 a	107,14 a
Borneo	106,70 b	25,10 b	21,69 d

Médias na coluna seguidas da mesma letra minúscula não apresentam diferenças significativa pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**TABELA 3** – Teor de açúcares solúveis em genótipos de bananeira aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de NaCl. UFRPE, Recife, 2002.

Genótipos	Teor de açúcares solúveis (mg.g <sup>-1</sup> de matéria fresca)			
	0	40	60	80
	..... NaCl (mM) .....			
Pacovan	55,67 Ba	98,00 ABa	108,67 Aa	124,00 Aa
S/N.2	24,67 Aa	46,67 Aa	52,33 Aab	54,67 Ac
Nanicão	53,67 Aa	60,00 Aa	61,33 Aab	82,33 Ab
Calcuttá-4	32,00 Aa	55,67 Aa	60,00 Aab	55,67 Ac
Microcarpa	59,00 Aa	74,00 Aa	77,00 Aab	88,33 Ab
Jaribuaia	47,33 Aa	58,33 Aa	58,33 Aab	59,33 Ac
IAC-AB	56,67 Aa	51,00 Aa	50,33 Ab	85,00 Ab
Borneo	39,67 Ba	55,00 Ba	60,00 Bab	82,00 Ab

Médias, na coluna, seguidas da mesma letra minúscula ou, na linha, seguidas da mesma letra maiúscula, não apresentam diferenças significativa pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**TABELA 4** – Teor de prolina em genótipos de bananeira aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de NaCl. UFRPE, Recife, 2002.

Genótipos	Teor de prolina ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matéria fresca)			
	0	40	60	80
	..... NaCl (mM) .....			
Pacovan	278,33 Aabc	295,33 Aa	340,67 Aab	300,33 Aabc
S/N.2	158,00 Abc	105,67 Aa	261,33 Aabc	182,67 Ac
Nanicão	179,33 Abc	250,00 Aa	282,67 Aabc	168,67 Ac
Calcuttá-4 (AA)	135,67 Ac	110,00 Aa	92,33 Ac	143,33 Ac
Microcarpa	331,33 Aab	253,00 Aa	186,67 Abc	290,00 Abc
Jaribuaia	302,33 Aab	298,33 Aa	284,33 Aabc	420,00 Aab
IAC-AB	371,00 ABa	297,67 Ba	420,33 ABa	514,00 Aa
Borneo	231,33 Abc	259,67 Aa	316,67 Aab	289,33 Abc

Médias, na coluna, seguidas da mesma letra minúscula ou, na linha, seguidas da mesma letra maiúscula, não apresentam diferenças significativa, pelo Teste de Tukey a de 5% de probabilidade.

**TABELA 5** – Teor de proteínas solúveis em genótipos de bananeira aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de NaCl. UFRPE, Recife, 2002.

Genótipos	Teor de proteínas solúveis ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matéria fresca)			
	0	40	60	80
	..... NaCl (mM) .....			
Pacovan	119,00 Ac	144,00 Aab	96,67 Abc	167,67 Aa
S/N.2	163,00 Ab	156,00 Aab	140,67 Aabc	69,00 Ab
Nanicão	116,33 Ac	129,33 Aab	164,00 Aabc	119,00 Aab
Calcuttá-4	77,00 Bc	69,33 Bb	61,00 Bc	143,00 Aa
Microcarpa	213,67 Aa	229,67 Aab	211,00 Aabc	258,67 Aa
Jaribuaia	153,00 Ab	190,00 Aab	292,67 Aa	258,33 Aa
IAC-AB	116,67 Ac	203,33 Aab	155,67 Aabc	241,67 Aa
Borneo	232,00 Aa	221,33 Aab	255,67 Aab	282,33 Aa

Médias, na coluna seguidas da mesma letra minúscula ou, na linha, seguidas da mesma letra maiúscula, não apresentam diferenças significativa pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Lacerda et al. (2001) comentaram que os genótipos de sorgo que mais reduziram o crescimento, em razão do estresse salino, foram os que mais acumularam prolina. Lutts et al. (1999) também consideram que a prolina, para cultivares de arroz, é mais um sintoma do estresse do que uma indicadora de tolerância à salinidade, pois as cultivares mais sensíveis acumularam maior quantidade de prolina do que as tolerantes. Também no presente trabalho, a prolina pode ser considerada mais como um indicador do estresse do que um agente protetor contra os efeitos do NaCl. Controvérsias são freqüentes na literatura quanto à resposta da prolina ao estresse. Lutts et al. (1999) explicaram que essas divergências devem-se ao fato de que a capacidade de acumulação de prolina pode variar entre as cultivares de uma mesma espécie e que a base metabólica da resistência à salinidade também pode variar durante o desenvolvimento da planta.

De maneira geral, o aumento do conteúdo de prolina, diferentemente dos carboidratos (Tabela 3), não mostrou relação direta com o aumento dos níveis de NaCl (Tabela 4). Muitas plantas do tratamento-controle apresentaram valores absolutos de prolina superiores aos das plantas submetidas ao NaCl, indicando que o conteúdo de prolina para os genótipos de bananeira não é um parâmetro de caracterização de tolerância à salinidade, uma vez que o tipo de soluto compatível utilizado no ajustamento osmótico nos organismos sob estresse salino está correlacionado com a magnitude da concentração do sal a que eles são expostos (PAGE-SHARP et al., 1999). Neste trabalho, verificou-se por meio do valor do coeficiente de correlação linear que as variáveis prolina e proteína solúvel apresentaram correlação positiva, não-significativa, de 49 %. Dos oito genótipos estudados, seis apresentaram maior incremento percentual de proteínas do que de prolina (Tabela 2). Fica evidente que o estresse salino não induziu degradação de proteínas, inferindo-se que o acúmulo de prolina tenha sido resultante da síntese *de novo*, decorrente da ativação da biossíntese pela via do glutamato que é catalisada pela Pirrolina-5 Carboxilato Sintetase (P5CS). Em

alguns trabalhos, associa-se o aumento de prolina à hidrólise de proteína, como ocorre em calos de feijão (BROETTO, 1995) e por outro lado, Lutts et al. (1999) comentam que, em arroz submetido à salinidade, o acúmulo de prolina não foi concomitante à redução da concentração de proteínas.

Pelos resultados do presente trabalho, observa-se que os açúcares solúveis totais desempenham um papel de destaque no mecanismo de tolerância ao estresse salino em plantas de bananeira cultivadas *in vitro*.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATES, L. S. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, Netherlands, n. 39, p. 205-207, 1973.
- 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**, New York, v. 72, p. 248-252, 1976.
- BROETTO, F. Tolerância à salinidade em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Sciencia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, n. 1, p. 164-166, 1995.
- CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; TORNE, J. M.; SANTOS, M. A. Efeito do estresse salino e da prolina exógena em calos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 12, n. 2, p. 146-155, 2000.
- DAS, N.; MISRA, M.; MISRA, A. Sodium chloride salt stress induced metabolic changes in callus culture of *Pear millet*: free solute accumulation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 137, p. 244-246, 1990.
- FAO. **Statistics**: agricultural production crops primary. 2003. Disponível em: <<http://www.faostat>>. Acesso em: 4 set. 2004.
- GOMES, E. W. F.; WILLADINO, L.; MARTINS, L. S. S.; CAMARA, T. R. Genotypes of banana (*Musa* spp.) under saline stress: tolerance and sensitivity. **Infomusa**, Montpellier, v. 11, n. 2, p. 13-18, 2002.

- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Anuário estatístico brasileiro**. Rio de Janeiro, 2001.
- KUMAR, S. G.; REDDY, A. M.; SUNDHAKAR, C. NaCl effects on metabolism in two high yielding genotypes mulberry (*Morus alba*, L.) with contrasting salt tolerance. **Plant Science**, Ireland, v. 165, p. 1245-1251, 2003.
- KUO, Y.; SMITH, M. A. L.; SPOMER, L. A. Merging callus level and whole plant microculture to select salt-tolerant seaside crooping bentgrass. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v. 17, n. 4, p. 549-560, 1994.
- LACERDA, C. F.; CAMBRAIA, J.; CANO, M. A. O.; RUIZ, H. A. Plant growth and solute accumulation and distribution in two sorghum genotypes, under NaCl stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 13, n. 3, p. 270-284, 2001.
- LUTTS, S.; MAJERUS, V.; KINET, J. M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, p. 450-458, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PAGE-SHARP, M.; BEHM, C. A.; SMITH, G. D. Involvement of the compatible solutes thehalose and sucrose in the response to salt stress of a cyanobacterial *Scytonema* species isolated from desert soils. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1472, n. 3, p. 519-528, 1999.
- PÉREZ-ALFOCEA, F.; GUERRIER, G.; BOLARIN, M. C. NaCl stress-induced organic solute changes on leaves and calli of *Lycopersicon esculentum*, *L. pennelli* and their interespecific hybrid. **Journal of Plant Physiology**, Stutgard, v. 143, p. 106-111, 1994.
- ROY, D.; BASU, N.; BHUNIA, A.; BANERJEE, S. K. Counteraction of exogenous L-proline with NaCl in salt sensitive cultivar of rice. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 35, n. 1, p. 69-72, 1993.
- SERRANO, R.; GAXIOLA, R. Microbial models and salt stress tolerance in plants. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 13, p. 121-138, 1994.
- SMIRNOFF, N. Plant resistance to environmental stress. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 9, p. 214-219, 1998.
- ULISSES, C.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ROCHA, P. S. G.; ALBUQUERQUE, C. Seleção *in vitro* de gemas de bananeira nanicação tolerantes à salinidade. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 667-670, 2000.
- VIÉGAS, R. A.; MELO, A. R. B.; SILVEIRA, J. A. G. Nitrate reductase activity and proline accumulation in cashew (*Anacardium occidentale*) in response to salt (NaCl) shock. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 11, n. 1, p. 21-28, 1999.
- WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Origen y naturaleza de los ambientes salinos. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; SÁNCHEZ, A. **La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis**. Madrid: Thompson, 2004. p. 303-330.
- YANO-MELO, A. M.; SAGGIN JUNIOR, O. J.; MAIA, L. C. Tolerance of mycorrhized banana (*Musa* sp. cv. Pacovan) plantlets to saline stress. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, [S.l.], v. 95, n. 1, p. 343-348, 2003.
- YEMM, E. W.; WILL, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, London, v. 57, p. 508-514, 1954.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **Sistema de análise estatística para microcomputadores – SANEST**. Pelotas: UFPel, 1984. 90 p.

# AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES DE SAIS MINERAIS PARA A MICROPROPAGAÇÃO DE *Nidularium fulgens* LAM.

## EVALUATION OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF MS AND KNUDSON MEDIA FOR MICROPROPAGATION OF *Nidularium fulgens* LAM.

PATRÍCIA DUARTE DE OLIVEIRA PAIVA<sup>1</sup>, VANESSA COELHO NAVES<sup>2</sup>, RENATO PAIVA<sup>3</sup>, MOACIR PASQUAL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Professor (a), Dr (a), Departamento de Agricultura – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 –37200-000 – Lavras, MG – pdolivei@ufla.br, mpasqual@ufla.br

<sup>2</sup>Engenheira Agrônoma, Mestre em Fitotecnia.

<sup>3</sup>Professor, Dr., Departamento de Biologia – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 –37200-000 – Lavras, MG – renpaiva@ufla.br

### RESUMO

Com a micropropagação de bromélias, permite-se a produção de mudas em larga escala para atender aos mercados nacional e internacional e, ainda, permitir a produção de exemplares para programas de reintrodução em habitats, quando se trata de espécies ameaçadas de extinção. Para esse processo, a composição do meio de cultura é bastante relevante, permitindo o estabelecimento de um protocolo eficiente e economicamente viável para a micropropagação da cultura. Objetivou-se neste trabalho avaliar o comportamento de plântulas de *Nidularium fulgens* Lam. em diferentes concentrações de sais de MS e de Knudson. Em todos os parâmetros analisados, a formulação salina do meio MS mostrou-se superior a do meio Knudson, não havendo necessidade de se modificar a sua concentração original.

**Termos para indexação:** Bromeliaceae, meios de cultura, micropropagação, *Nidularium fulgens*.

### ABSTRACT

The micropropagation of bromeliads allows the production of plantlets in large scale to cover the demand of national and international markets. Also, the in vitro culture allows plant production for programs that deal with endangered species. For this propose, the definition of the culture medium composition is very important, for the establishment of an efficient in vitro regenerative protocol. The objective of this work was to evaluate the behavior of *Nidularium fulgens* Lam. plantlets in different concentrations of the MS and Knudson salt formulations. For all the analyzed parameters, the MS salt formulation was superior to Knudson with no need to modify the original salt concentrations.

**Index terms:** Bromeliaceae, culture media, micropropagation, *Nidularium fulgens*.

### INTRODUÇÃO

As bromeliáceas são plantas que impressionam por suas formas exóticas e pela ampla gama de cores e variedade

de suas flores e folhas. Possuem grande valor para arranjos e vasos de interior e ocupam sempre lugar de destaque em projetos paisagísticos.

Além da importância ornamental, as bromélias apresentam também importante função na ecologia de vários ambientes, servindo como alimento e local de proteção para muitos animais, atuando como reservatórios de água em ambientes mais secos e, pela decomposição de suas folhas, proporcionam a formação de solo viável para sobrevivência de espécies vegetais mais exigentes (LEME & MARIGO, 1993; OLIVEIRA et al., 1994).

Em razão da falta de informações específicas sobre técnicas de propagação e cultivo, tem sido desestimulada a produção de bromélias, sendo, muitas vezes, as espécies oferecidas para comercialização provenientes de extrativismo (MELO, 1996). Em muitos casos, essas espécies são retiradas de populações com poucos representantes, como é o caso do *Nidularium fulgens* Lam., que ocorre na Mata Atlântica dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, e por ser muito cobiçada por colecionadores, vem sendo alvo do extrativismo.

Na natureza, assim como em pequenos viveiros onde são cultivadas, as bromélias podem ser propagadas por meio de sementes (DOSOLTO, 2001; RAUH, 1990). No entanto, o desenvolvimento das mudas com base nesse processo é bastante lento. A emissão de brotações laterais

(Recebido em 17 de março de 2004 e aprovado em 25 de maio de 2005)

ou filhos é uma forma natural de propagação vegetativa, comum entre as bromélias (CÂNDIDO, 1996). No entanto, o número de brotações produzidas por planta é geralmente pequeno, não sendo suficiente para suprir a demanda do mercado crescente.

Com a micropropagação, possibilita-se a produção de plantas em larga escala, num período reduzido de tempo e proporcionando maior uniformidade e qualidade das mudas em relação aos métodos convencionais. Mediante a propagação massal de bromélias é possível produzir mudas para reintrodução em habitats e para comercialização, atendendo aos mercados interno e externo e, conseqüentemente, coibindo práticas extrativistas (NUNES & FORZZA, 1998; ZORNING, 1996). Isso é favorecido pelo fato de a taxa de multiplicação de bromélias *in vitro* ser geralmente superior àquela obtida *ex vitro* (MERCIER & KERBAUY, 1995).

O meio de cultura baseado na formulação MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) tem sido utilizado como básico para propagação de algumas espécies de bromélias tais como *Aechmea fasciata* Baker e *Guzmania ssp* (PIERIK et al., 1984); *Tillandsia cyanea* (PIERIK & SPRENKELS, 1988), *Aechmea victoriana* L.B. Sm. e *Aechmea dactylina* Baker (DIJCK et al., 1988), *Neoregelia carolinae* (Beer) L. B. Sm. (TOMBOLATO et al., 1991).

A formulação de Knudson foi desenvolvida em 1946 para propagação de sementes de orquídeas (GEORGE, 1996), mas também já foi testada para propagação de bromélias tais como *Vriesea fosteriana* L.B. Sm. e *Vriesea hieroglyphica* E. Morren (MERCIER & KERBAUY, 1992, 1994, 1995). Para a micropropagação de *Nidularium fulgens*, no entanto, nenhum registro foi encontrado.

No presente trabalho, objetivou-se avaliar a multiplicação *in vitro* da bromélia *Nidularium fulgens*, cultivada em diferentes concentrações dos sais de MS e Knudson, a fim de determinar o meio mais adequado para a multiplicação rápida dessa espécie.

## MATERIALE MÉTODOS

A partir de matrizes *Nidularium fulgens* mantidas no Viveiro de Plantas Ornamentais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, obtiveram-se frutos, dos quais se extraíram as sementes. As sementes foram envoltas em gaze, formando uma trouxinha e, posteriormente, desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (produto comercial) a 30%. Após 20 minutos, as sementes foram lavadas em água destilada, em câmara de fluxo laminar. Procedeu-se então à inoculação *in vitro*, colocando-se as sementes em frascos com 30 mL de meio constituído de sais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962). Os frascos foram colocados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, irradiância de  $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , permanecendo assim por 60 dias para desenvolvimento dos explantes. Esses então constituíram a cultura estoque, cujas plântulas foram utilizadas como explantes para os experimentos.

O experimento foi constituído por três concentrações dos sais de MS (50%, 100% e 150%) e três concentrações dos sais de Knudson (50%, 100% e 150%). Em todos os tratamentos foram adicionados thidiazuron (TDZ) na concentração  $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $7,0 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar e o pH foi ajustado para 5,8, antes do processo de autoclavagem, realizado a  $121^\circ\text{C}$ , 1 atm por 20 minutos. Os meios foram distribuídos em tubos de ensaio, no volume de 20 ml em cada.

Após a inoculação em câmara de fluxo laminar, os tubos contendo os explantes foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, irradiância de  $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , permanecendo nessas condições durante 120 dias.

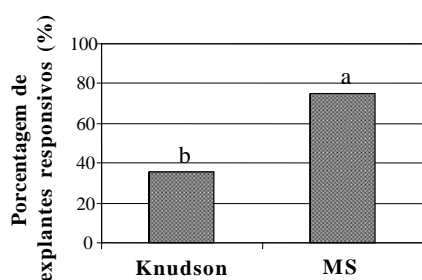
O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada parcela constituída por quatro tubos de ensaio contendo uma planta por tubo. As plântulas formadas foram avaliadas aos 120 dias, observando-se a porcentagem de explantes responsivos, número e tamanho dos brotos formados, comprimento do explante matriz e ocorrência de intumescimento.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os parâmetros analisados neste experimento, não houve interação entre as diferentes formulações salinas e as concentrações utilizadas como meio de cultura, para todas as características avaliadas.

Pela avaliação da porcentagem de explantes responsivos observou-se que a resposta foi superior em cultivo em sais de MS em comparação com sais de Knudson, conforme se visualiza na Figura 1, demonstrando que a presença de nutrientes oferecidos pela formulação de MS foi fundamental para estimular o desenvolvimento. Não houve diferença significativa entre as concentrações testadas de sais de Knudson e de MS, segundo os testes de médias aplicados.

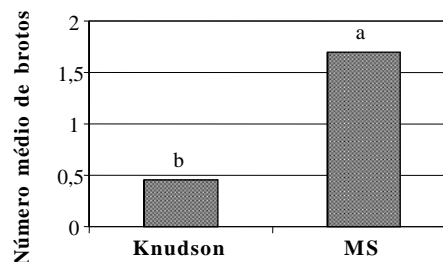


Nota: Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

**FIGURA 1** – Porcentagem de explantes responsivos em *Nidularium fulgens* cultivados em diferentes formulações salinas.

O número médio de brotações formadas também foi influenciado pela formulação de sais utilizada, tendo sido mais elevado na formulação de MS em comparação com a formulação de Knudson, com 1,7 e 0,46 brotos por explante, respectivamente (Figura 2). Para esse parâmetro, porém, não houve diferença entre as concentrações utilizadas das formulações de Knudson e de MS.

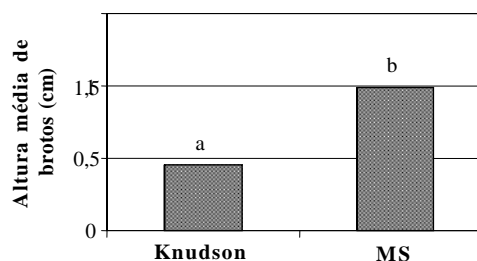
Em meio Knudson, mais pobre em nutrientes, o número médio de brotações emitidas foi bastante inferior, em comparação ao meio MS, de acordo com as considerações de George (1996).



Nota: Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

**FIGURA 2** – Número médio de brotos formados em explantes de *Nidularium fulgens* cultivados *in vitro*.

A altura média de brotos formados *in vitro* apresentou comportamento semelhante ao observado para o número de brotações, ocorrendo média de 0,46 cm para os cultivados nos sais de Knudson e 1,0 cm para os sais de MS (Figura 3). Entre as diferentes concentrações de cada meio, também não houve diferença entre as alturas dos brotos formados nos dois tipos de formulação de sais minerais utilizados.



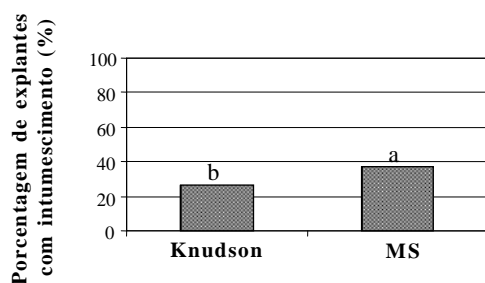
Nota: Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

**FIGURA 3** – Altura média de brotos de *Nidularium fulgens* formados em explantes cultivados em diferentes meios de cultura.

O intumescimento é um tipo de formação que precede a emissão de brotações. Nos explantes cultivados em sais de Knudson, 26,42% apresentaram intumescimento, ao passo que no meio MS, essa resposta ocorreu em 37,5%, (Figura 4). O intumescimento em explantes de bromélias parece ser uma reação comum das plantas dessa família, já

tendo sido relatada anteriormente por Carneiro (1997), que registrou a presença de protuberâncias no cultivo de explantes de bromélias. Trata-se de um crescimento na base do explante, diferindo da formação de calos por apresentar um aspecto liso, como de um bulbo, mas sem interferência na formação de brotos. Segundo os mesmos autores, o intumescimento tende a aumentar quando se associa citocinina a uma auxina no meio de cultura.

Para os explantes cultivados em diferentes concentrações de sais de MS, não houve diferença em



Nota: Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

**FIGURA 4** – Porcentagem de explantes de *Nidularium fulgens* com presença de intumescimento.

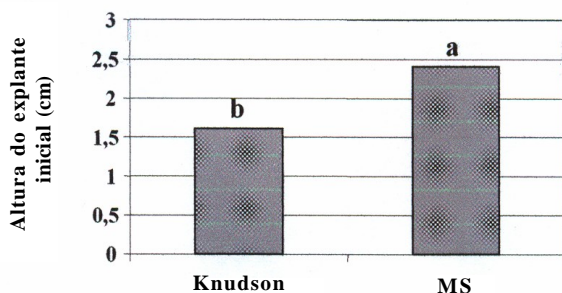
relação à ocorrência de intumescimento (Tabela 1). Ao contrário, as diferentes concentrações de sais de Knudson influenciaram na ocorrência desse fator, que ocorreu em maior proporção quando se utilizou a formulação original (100%), tendo sido bastante reduzida em concentração mais baixa, indicando que esse fator está relacionado com a presença de maiores concentrações de nutrientes no meio.

Em relação ao crescimento do explante inicial, observado aos 60 dias depois de inoculado em meio de cultura, observou-se um maior crescimento quando cultivado em sais de MS, chegando à média de 2,4 cm de comprimento, ao passo que, para os cultivados em sais de Knudson, a média foi de 1,6 cm (Figura 5). Ao contrário dos outros parâmetros, a diferença no comprimento do explante inicial após 60 dias de cultivo, foi significativa quando se compararam as diferentes concentrações de sais de Knudson, crescendo proporcionalmente à medida que se aumentou a concentração desses sais, como ilustrado na Tabela 1. Para os sais de MS não ocorreu diferença estatística entre as concentrações testadas (Tabela 1).

**TABELA 1** – Explantes de *Nidularium fulgens* com presença de intumescimento (%) e altura do explante inicial (cm), em função das diferentes concentrações de sais de MS e de Knudson.

Meios de cultura – concentrações de sais (%)	MS		Knudson	
	Intumescimento (%)	Altura do explante inicial (cm)	Intumescimento (%)	Altura do explante inicial (cm)
50	37,5 a	2,1 a	20,0 b	1,1 b
100	20,0 a	2,6 a	52,5 a	1,5 ab
150	21,76 a	2,5 a	40,0 ab	2,2 a

Nota: Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.



Nota: Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

**FIGURA 5** – Altura média do explante inicial de *Nidularium fulgens* em cultivo *in vitro* em diferentes meios de cultura.

Observa-se que os sais de MS proporcionaram maior desenvolvimento do explante e maior número de brotos, sendo esses de maior tamanho, demonstrando não ter ocorrido concorrência entre a formação de brotos e a altura desses. Em nenhum dos meios de cultura, houve formação de raízes nos explantes.

### CONCLUSÕES

Os sais de MS são superiores aos de Knudson para todos os parâmetros estudados para propagação de *Nidularium fulgens*, não havendo necessidade de se modificar a sua concentração original.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CÂNDIDO, M. S. D. Cultivando *Chryphantus*. **Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p. 33-37, 1996.

CARNEIRO, L. A. **Controle da morfogênese *in vitro* de três espécies de bromélias endêmicas do Sudeste brasileiro**. 1997. 87 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1997.

DIJCK, R. V.; PROFT, M.; GREEF, J. Role of ethylene and cytokinins in the initiation of lateral shoot growth in bromeliads. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 86, p. 836-840, 1988.

DOSOLTO, R. Bromélias semeadas, bromélias preservadas. Entrevistador: Rose Aiello Blanco. **Jardim de flores**, São Paulo, 2001. Disponível em: <<http://www.jardimdeflores.com.br/ECOLOGIA/bromelia1.html#topo1>>. Acesso em: 4 set. 2001.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1: the technology**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1574 p.

LEME, E. M. C.; MARIGO, L. C. **Bromélias na natureza**. Rio de Janeiro: Ed. Marigo, 1993. 183 p.

MELO, T. B. Bromélias no paisagismo. **Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p. 3-7, 1996.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 30, p. 247-249, 1992.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of the Bromeliad Society**, Los Angeles, v. 44, p. 120-124, 1994.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. **Selbyana**, Sarasota, v. 16, n. 2, p. 147-149, 1995.

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

NUNES, J. V. C.; FORZZA, R. C. Bromélias. **Projeto Inventário dos recursos naturais da Mata Atlântica**, São Paulo, v. 1, n. 1, 1998. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/nipe/rbma/bromain.htm>>. Acesso em: 4 set. 2001.

OLIVEIRA, M. G. N.; ROCHA, C. F. D.; BANGNALL, T. A comunidade animal associada à bromélia-tanque *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith. **Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 22-29, 1994.

PIERIK, R. L. M.; SPRENKLENS, P. A. Micropropagation of *Tillandsia cyanea*. **Journal of the Bromeliad Society**, Los Angeles, v. 38, n. 2, p. 9-12, 1988.

PIERIK, R. L. M.; STEEGMANS, H. H. M.; HENDRIKS, J. The influence of naphthaleneacetic acid on the growth of in vitro-cultivated seedlings of Bromeliaceae. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 24, p. 193-199, 1984.

RAUH, W. **The bromeliad lexicon**. London: Blandford, 1990. 215 p.

TOMBOLATO, A. F. C.; TABEBAYASHI, S. S. G.; COSTS, A. M. M.; QUIRINI, E. A. Cultura *in vitro* da Bromélia. **O Agrônomo**, Campinas, v. 43, n. 2/3, p. 77-78, 1991.

ZORNING, R. K. Micropropagação de bromélias. **Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 3, p. 3-8, 1996.

# EFEITO DE SUBSTRATOS NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE MOGNO (*Swietenia macrophylla* KING)

## EFFECT OF SUBSTRATES FOR *IN VITRO* GERMINATION OF MAHOGANY (*Swietenia macrophylla* KING)

OSMAR ALVES LAMEIRA<sup>1</sup>, SEBASTIÃO DA CUNHA LOPES<sup>2</sup>, NOEMI VIANNA MARTINS LEÃO<sup>3</sup>,  
IRACEMA MARIA CASTRO COIMBRA CORDEIRO<sup>4</sup>, LANA ROBERTA SOUSA REIS<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Engenheiro Agrônomo, Dr, Embrapa Amazônia Oriental – Caixa Postal 48 – 66.095-100 – Belém, PA – osmar@cpatu.embrapa.br

<sup>2</sup>Engenheiro Agrônomo, M.Sc., Bolsista CNPq/Museu Goeldi – Belém, PA.

<sup>3</sup>Engenheira Florestal, MSc, Embrapa Amazônia Oriental – Caixa Postal 48 – 66.095-100 – Belém, PA.

<sup>4</sup>Engenheira Florestal, Doutoranda Universidade Federal Rural da Amazônia/UFRA – Belém, PA.

<sup>5</sup>Engenheira Agrônoma CNPq/Embrapa Amazônia Oriental.

### RESUMO

Realizou-se este trabalho com o objetivo de verificar o efeito de substratos e diferentes condições de luz e temperatura na germinação de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) *in vitro* visando à produção de explantes para iniciar o processo de micropropagação. No primeiro experimento, as sementes foram inoculadas em dois substratos: ágar a 7g.L<sup>-1</sup> e vermiculita, e mantidas em temperatura de 25±1°C sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 25 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de irradiância. O meio de cultura utilizado foi o MS, suplementado com sacarose (10; 20; e 30g.L<sup>-1</sup>). Para o segundo experimento, as sementes foram submetidas às condições de luz (presença e ausência) e temperatura (25 e 30 °C), sendo utilizado o meio de cultura MS com 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose + vermiculita. A vermiculita foi superior ao ágar como substrato para a germinação de sementes de mogno *in vitro*. O meio MS adicionado de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + vermiculita foi o mais eficiente na germinação de sementes de mogno *in vitro*. As temperaturas de 25 °C e 30 °C, independentemente da presença ou ausência de luz, não influenciaram no número e tempo de germinação *in vitro* dessas sementes.

**Termos para indexação:** Cultura de tecido, vermiculita, ágar, temperatura, *Swietenia macrophylla*, mogno.

### ABSTRACT

The objective of this work was to verify the effect of substrates and different light conditions and temperature on *in vitro* germination of mahogany (*Swietenia macrophylla* King) seeds for the production of explants for the initial process of micropropagation. In the first experiment the seeds were inoculated in two substrates: 7g.L<sup>-1</sup> agar and vermiculite, maintained at temperature of 25±1°C with photoperiod of 16 hours and 25 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> irradiance. MS medium supplemented with sucrose (10; 20; and 30g L<sup>-1</sup>) was used. For the second experiment the seeds were submitted to light conditions (presence and absence) and temperature (25 and 30 °C) and inoculated in MS medium supplemented with 30g L<sup>-1</sup> sucrose + vermiculite. The

vermiculite was more efficient than agar as substrate for the *in vitro* seed germination of mahogany. The MS medium, supplemented with 30g L<sup>-1</sup> sucrose + vermiculite, was more efficient for the *in vitro* seed germination of mahogany. The temperatures of 25 and 30 °C independent of the presence or absence of light had no influence in the number and time for the *in vitro* germination of these seeds.

**Key words:** Tissue culture, vermiculite, agar, temperature, *Swietenia macrophylla*, mahogany.

### INTRODUÇÃO

O mogno (*Swietenia macrophylla* King), espécie florestal pertencente à família das Meliaceae adapta-se a diferentes habitats, podendo ser encontrado em altitudes que variam de 0 a 1500 m (Peru e Bolívia); porém, encontra ótimas condições para seu pleno desenvolvimento em florestas tropicais (LAMB, 1966). Devido à cor da madeira, estabilidade dimensional e características organolépticas, que proporcionam diversidade de uso e fácil acabamento, essa espécie está entre as de maior valor econômico, tanto no mercado interno como externo, alcançando US\$ 800 o metro cúbico (VERÍSSIMO et al., 1995). Esses valores têm contribuído de forma bastante acelerada para sua exploração nas áreas de ocorrência natural, visto que todo o mogno comercializado no mercado internacional provém de árvores extraídas de florestas primárias (RODAN et al., 1992).

(Recebido em 02 de setembro de 2003 e aprovado em 13 de julho de 2005)

A propagação dessa espécie por meio de sementes esbarra na difícil execução de coletas devido ao porte da árvore e à perda da viabilidade em um curto espaço de tempo. Para Carvalho (1994), espécies que apresentam esses problemas, ou baixo percentual de germinação, que possam impedir a reposição da espécie, a micropropagação *in vitro* aparece como ferramenta importante para suprir essas dificuldades. De acordo com Grattapaglia & Machado (1990), entre as técnicas de cultura de tecidos, a micropropagação é a mais difundida e a que possibilita obter plantas do mesmo genótipo em larga escala e em um curto espaço de tempo, promovendo a conservação do material genético e favorecendo o melhoramento da espécie.

Devido às dificuldades de descontaminação de explantes provenientes de campo, tem-se preferido a utilização de material vegetal oriundos de sementes germinadas em condições assépticas (COELHO, 1999). Para Marcos Filho et al. (1987), para ocorrer a germinação, é necessário que a semente seja colocada sob condições ambientais favoráveis. O mesmo autor explica ainda que para garantir o crescimento do embrião, é preciso que o fornecimento de água, temperatura e luz estejam em quantidades ideais para que uma semente germine normalmente, caso contrário, será prejudicial, ocasionando anormalidade nas plântulas.

No processo de micropropagação, para dar suporte aos explantes "*in vitro*", o ágar tem sido o mais utilizado, porém, Grattapaglia & Machado (1990) indicam a vermiculita como uma alternativa mais barata, além do que possui capacidade de reter água, ar e nutriente, os quais são transferíveis às plantas.

No contexto, como para o mogno não se têm essas informações, há necessidade de primeiramente ser determinada qual a melhor condição para que as sementes possam germinar de maneira mais eficiente. Objetivou-se com este trabalho verificar o efeito de substratos e diferentes condições de luz e temperatura na germinação de sementes mogno *in vitro*, visando à produção de explantes para iniciar o processo de micropropagação.

## MATERIALE MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental em duas etapas. O tegumento das sementes foi retirado manualmente, para não danificar sua estrutura interna. Em seguida, elas foram lavadas com água e sabão líquido para retirada de uma fina camada de pó esbranquiçado que se encontra aderida na superfície. Em câmara de fluxo laminar, foi realizada a desinfestação com álcool a 70% por dois minutos, seguida de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% por quinze minutos. Em seguida, foram lavadas por quatro vezes com água destilada e autoclavada.

Para maior eficiência da esterilização, a vermiculita utilizada foi autoclavada duas vezes à temperatura de 120 °C por 30 minutos, antes de ser associada ao meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

Na primeira etapa, foram testados os seguintes tratamentos: MS + 10g.L<sup>-1</sup> de sacarose; MS + 20g.L<sup>-1</sup> de sacarose; MS + 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose; MS + 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose + vermiculita; 7g.L<sup>-1</sup> de ágar e vermiculita. A autoclavagem dos meios de cultura foi realizada a 120 °C e 1,2 atm durante 15 minutos. Após a inoculação em tubos de ensaio (15x200 mm), as sementes foram postas em sala de incubação à temperatura de 25 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria e 52 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de irradiância. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com seis tratamentos e sete repetições, sendo a unidade experimental constituída de quatro tubos de ensaios contendo uma semente em cada um.

Na segunda etapa, foram utilizados quatro tratamentos em que foram testados os fatores luz em dois níveis (ausência e presença) e temperatura em dois níveis (25 e 30 °C). As sementes foram inoculadas em tubos de ensaios contendo meio MS, suplementado de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + vermiculita como substrato. Posteriormente, foram mantidos em sala de crescimento e em Biotron na temperatura de 25 °C e 30 °C, respectivamente, com fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria e 52 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>

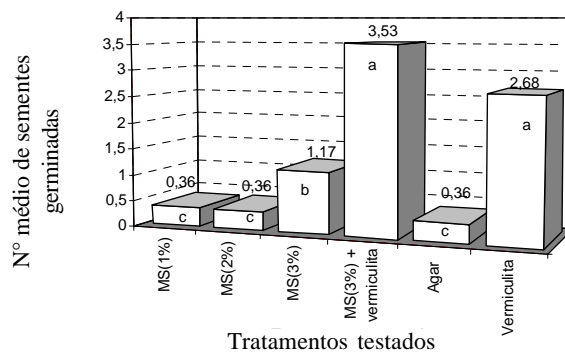
de irradiância. Para proporcionar as condições de ausência de luz nos tratamentos, os tubos com as sementes foram colocados em caixa de alumínio cobertas com manta preta, sem que houvesse penetração de luminosidade.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com seis repetições e a unidade experimental, formada de cinco tubos contendo uma semente em cada um. Para fins de análise estatística, a variável número de sementes germinadas foi transformada em  $\sqrt{x + 0,5}$  e, para o teste de comparação de médias, foi usado o teste de Duncan a  $\alpha = 0,05$  de probabilidade, ao passo que para a variável tempo de germinação, não houve transformação. Os dados foram coletados diariamente durante 35 dias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise da variância, houve diferença significativa para o número de sementes germinadas. Pelo teste de Duncan a 1% de probabilidade, demonstrou-se que os tratamentos mais eficientes foram (MS) 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + vermiculita e a vermiculita sem adição de solução nutritiva, não havendo diferença significativa entre ambos, com 3,53 e 2,68 de sementes germinadas, respectivamente (Figura 1).

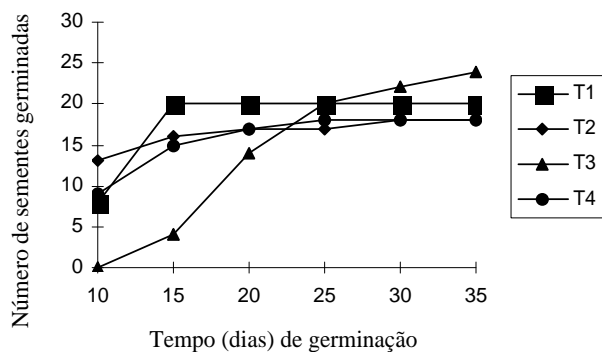
A germinação iniciou-se pelo aparecimento do eixo embrionário, saindo lateralmente à semente, sendo possível observar o surgimento de plântulas a partir de seis dias após a inoculação. Verificou-se, pelo resultado, que o mogno é uma espécie que possui germinação rápida, se comparada com pau-rosa (*Aniba roseadora* Ducke), que é uma espécie florestal cujo processo de germinação “*in vitro*” inicia-se a partir de 15 dias (FRANÇA et al., 1997). É importante ressaltar que algumas sementes de espécies florestais necessitam de até cinco meses para entrar em atividade metabólica. O epicótilo das plântulas apresentou crescimento rápido, sendo o mesmo resultado relatado por Lemos et al. (1998) que, ao inocularem sementes de mogno *in vitro*, observaram o rápido crescimento das plântulas, atingindo aos dez dias a altura de 40 a 65 mm.



**FIGURA 1** – Número médio de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla*) germinadas *in vitro* nos diferentes substratos e diferentes concentrações de sacarose (10; 20 e 30g.L<sup>-1</sup>). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Duncan, a 1%.n=28.

O menor número de sementes germinadas ocorreu nos tratamentos em que foi utilizado o meio MS adicionado às concentrações de 10 e 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, e ágar sem meio nutritivo (Figura 1). Pelos resultados obtidos, a vermiculita foi responsável pelo maior número de sementes germinadas, tanto em meio MS contendo 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, quanto empregada isoladamente. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Lessa (1998), que trabalhou com sementes de macieira (*Malus domestica* Baumg). Sharid (1975) também relata que a vermiculita depois de expandida aumenta grandemente sua capacidade de retenção de água, ar e nutrientes transferíveis às plantas.

Os fatores luz, temperatura e as interações desses não influenciaram o número e o tempo de germinação das sementes de mogno. Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre os tratamentos, foi observado (Figura 2) que na temperatura de 30 °C ocorreu, inicialmente com 10 dias, maior número de sementes germinadas, independente da presença (T<sub>2</sub>) ou ausência de luz (T<sub>4</sub>), mantendo-se com números similares a partir de 15 dias após inoculação até 35 dias, final da avaliação. No tratamento em que as sementes foram mantidas à temperatura de 25 °C, na presença de luz (T<sub>1</sub>), o número de germinação a partir de 15 dias após a inoculação foi similar até o final da avaliação.



O maior número de sementes germinadas ocorreu a partir de 25 dias após a inoculação até o final da avaliação, na temperatura de 25 °C e ausência de luz (T<sub>3</sub>). Ao que parece, a temperatura de 30 °C acelerou a germinação nos primeiros 10 dias após a inoculação, ao passo que, na temperatura de 25 °C, esse processo foi maior a partir de 25 dias, independentemente da presença ou ausência de luz.

Para Borges & Rena (1993), as sementes apresentam comportamento variável diante desses fatores, principalmente em relação à temperatura, não havendo uma temperatura ótima e uniforme para que ocorra germinação de todas as espécies. Entretanto, esses mesmos autores relatam que a faixa de 20 a 30 °C tende a ser a mais adequada para germinação de grande número de espécies subtropicais e tropicais. Resultados similares foram observados por Franco & Ferreira (2002) com a espécie florestal *Didymopanax morototoni* Decne & Planch (morototo), em que as sementes germinaram, independentemente das condições de luz.

### CONCLUSÕES

Neste trabalho, a vermiculita, na presença ou ausência de solução nutritiva, demonstrou ser superior ao ágar como substrato para a germinação de sementes de mogno *in vitro* e as temperaturas de 25 °C e 30 °C, independentemente da presença ou ausência de luz, não influenciam no número e tempo de germinação.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORGES, E. E. de L. E.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B. de; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília, DF: ABRATES, 1993. 350 p.

CARVALHO, I. P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa-CNPQ, 1994.

COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]**. 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

FRANCO, T. H. E.; FERREIRA, A. G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Didymopanax morototoni* (Aubl) Dcne et Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2002.

FRANÇA, R. B. de; SANTOS, D. S. B.; MOTA, M. G. da C.; VIEIRA, I. M. da S.; CABRAL, B. L. R. Indução e crescimento de plântulas de pau-rosa (*Aniba roseodora* Ducke) *in vitro*. In: REUNIÃO DOS BOTÂNICOS DA AMAZÔNIA, 2., 1997, Salinópolis, Pará. **Resumos...** Salinópolis: [s.n.], 1997. p. 54.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP/Embrapa-CNPQ, 1990. 433 p.

LAMB, F. B. **Mahogany of tropical America: its ecology and management**. Michigan: The University of Michigan, 1966. 219 p.

LEMO, O. F. de; LOPES, S. da C.; MENEZES, I. C. de; LAMEIRA, O. A.; OLIVEIRA, M. do S. P. O. Produção de plântulas para micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla* King). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 44., 1998, Águas de Lindóia, SP. **Resumos...** Águas de Lindóia: [s.n.], 1998. p. 216.

LESSA, A. O. **Utilização de microenxertia para obtenção de plantas de *Malus domestica* Borkh livres do vírus da mancha clorótica das plantas da macieira (Aclsv)**. 1998. 140 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1998.



---

MARCOS FILHO, J.; CICERO, M. S.; SILVA, W. R. da. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 320 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with

tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

RODAN, B.; NEWTON, A.; VERÍSSIMO, A. Mahogany conservation: status and policy initiatives.

**Environmental Conservation**, [S.l.], v. 19, n. 4, p. 331-342, 1992.

SHARID, F. Vermiculite: the popcorn mineral. **Science Chronicle**, [S.l.], v. 13, n. 2, p. 85-86, 1975.

VERÍSSIMO, A.; BARRETO, P.; TARIFA, R.; UHL, C. A. Extraction of a high-value natural resource in Amazonia: the case of mahogany. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 72, p. 39-60, 1995.

# GROWTH REGULATORS PULSING PRE-TREATMENT EFFECT ON THE *Eucalyptus grandis* SHOOT AND ADVENTITIOUS ROOT MORPHOGENESIS

## EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM PULSOS DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NA MORFOGÊNESE DE BROTAÇÕES E RAÍZES ADVENTÍCIAS DE *Eucalyptus grandis*

EDGARD AUGUSTO DE TOLEDO PICOLI<sup>1</sup>, ACELINO COUTO ALFENAS<sup>2</sup>, ROBSON MAIA GERALDINE<sup>3</sup>, LETÍCIA DE ALMEIDA GONÇALVES<sup>4</sup>, WAGNER CAMPOS OTONI<sup>1</sup>, LEONARDO LUCAS CARNEVALLI DIAS<sup>5</sup>, DANIELA ANDRADE NEVES<sup>6</sup>, SHINITIRO ODA<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Vegetal – Universidade Federal de Viçosa/UFV – Viçosa, MG, Brasil – 36. 570 000 – epicoli@alunos.ufv.br

<sup>2</sup>Departamento de Fitopatologia, BIOAGRO – Universidade Federal de Viçosa /UFV– Viçosa, MG.

<sup>3</sup>Pesquisador DCR/CNPq/SECTEC – Goiânia,GO.

<sup>4</sup>Departamento de Biologia Geral - Área Botânica – Universidade Federal de Goiás/UFG – Goiânia, GO.

<sup>5</sup>Engenheiro Agrônomo – Estudante de MS – DBV/BIOAGRO – Universidade Federal de Viçosa /UFV – Viçosa, MG.

<sup>6</sup>Engenheiro Florestal – Estudante de MS – DFT/BIOAGRO – Universidade Federal de Viçosa /UFV– Viçosa, MG.

<sup>7</sup>Engenheiro Florestal, Suzano Papel e Celulose.

### RESUMO

Foram avaliadas as respostas morfológicas de explantes de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden submetidos a altas concentrações de reguladores de crescimento, e a pré-tratamentos combinando as concentrações de 10, 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) por períodos de 6, 12, 24 e 48 horas. Plântulas intactas apresentaram maior indução de raízes adventícias (~7 raízes/explante), comparados a cotilédones e hipocótilos isolados (<1,5 raízes/explante). O ácido 3-(benzo[b]selenil) acético (ABSAs), ácido indol acético (AIA), ácido indolbutírico (IBA), ácido naftalenoacético (ANA) e 2,4-D aumentaram (>10 raízes/explante), enquanto thidiazuron (TDZ), zeatina (ZEA), 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina (CIN) inibiram (<1 raízes/explante) a morfogênese de raízes adventícias. A embriogênese somática não foi induzida em nenhum dos tratamentos avaliados. O alongamento do epicótilo foi inibido por TDZ, CIN, 2,4-D, BAP e ABSAs, não sendo observado para AIA, AIB, ANA e ZEA. BSAA promoveu maior indução de raízes adventícias. O alongamento do epicótilo e o número médio de raízes diminuíram, enquanto a necrose aumentou, com maiores concentrações e exposição a 2,4-D, sugerindo a dependência dessas respostas a essas variáveis.

**Termos para indexação:** “Pulsing”, morfogênese *in vitro*, *Eucalyptus grandis*.

### ABSTRACT

The morphogenic responses of *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden explants were evaluated when submitted to high concentrations of growth regulators, and to combinations of 10, 50 and 100 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 6, 12, 24 and 48h pre-treatments. Intact plantlets displayed the

highest adventitious root induction (~7roots/explant) compared to isolated hypocotyl and cotyledon explants (<1,5roots/explant). The 3-(benzo[b]selenyl) acetic acid (BSAA), indolacetic acid (IAA), indolbutyric acid (IBA), naphthaleneacetic acid (NAA) and 2,4-D enhanced(>10 roots/explant) whereas thidiazuron (TDZ), zeatin (ZEA), 6-benzylaminopurine (BAP) and kinetin (KIN) inhibited (<1 roots/explant) adventitious root morphogenesis. Somatic embryogenesis was not induced in the present treatments. Epicotyl elongation was inhibited by TDZ, KIN, 2,4-D, BAP and BSAA, whereas IAA, IBA, NAA and ZEA did not. BSAA promoted higher adventitious root induction. Epicotyl elongation and average number of roots per explant decreased, whereas explant necrosis augmented, with higher exposure to 2,4-D, suggesting morphogenic response dependence on these variables.

**Index terms:** Pulsing, *in vitro* morphogenesis, *Eucalyptus grandis*.

### INTRODUCTION

There are several protocols for regenerating *Eucalyptus* adventitious shoots (BANDYOPADHYAY et al., 1999; CID et al., 1999; HARCOURT et al., 2000; NUGENT et al., 2001; TIBOK et al., 1995) and somatic embryos (BANDYOPADHYAY et al., 1999; TERMIGNONI et al., 1996; TIBOK et al., 1995; WATT et al., 1991). These protocols also use different explant sources such as leaf (CID et al., 1999), seedlings (TERMIGNONI et al., 1996),

(Recebido em 13 de maio de 2005 e aprovado em 01 de agosto de 2005)

cotyledon (NUGENT et al., 2001), cotyledonary nodes (CID et al., 1999) and hypocotyls (TIBOK et al., 1995). All of them are grounded on callus induction, which further produces shoots and embryos whilst transferred and maintained onto growth regulators-containing medium.

Recently, it was observed that hormone-pulsing could enhance or either promote *in vitro* regeneration in guava tree (GUERRA et al., 2000), highbush blueberry (CAO et al., 2002), quince (D'ONOFRIO & MORINI, 2004) and in ginseng (KEVERS et al., 1999, 2000). Albeit different pulsing pre-treatment period, these protocols were successful in root (KEVERS et al., 1999), embryo (GUERRA et al., 2001; KEVERS et al., 2000) and shoot (CAO et al., 2002) regeneration.

Despite the availability of eucalypt regeneration protocols (BANDYOPADHYAY et al., 1999; CID et al., 1999; HARCOURT et al., 2000; NUGENT et al., 2001; TERMIGNONI et al., 1996; TIBOK et al., 1995; WATT et al., 1991), in the present work *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden explants were submitted to high concentrations of growth regulators during short pre-treatment periods in order to evaluate its morphogenic responses.

## MATERIALS AND METHODS

*Eucalyptus grandis* seeds from a controlled crossing were surface-sterilized by immersion into 70% (v:v) ethanol for 5min, followed by 5min in a 10% (v:v) hydrogen peroxide solution, and a final dip in a 5% (w:v) calcium hypochlorite solution containing 0.1% (v:v) Tween 20. In the next step, the seeds were rinsed four times in sterile distilled water, blotted on filter papers, and then were germinated *in vitro* in sterile and moistened filter paper. Seeds were kept in the dark for the first seven days and afterwards were maintained under 16h light regime, 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  light radiation provided by two fluorescent tubes (Luz do Dia Especial, 20 W, Osram) for additional 3 to 5 days. The culture room temperature was kept at  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ .

*In vitro*-grown seedlings (10–12 d old) were used as the source of plantlet (PL), hypocotyl (HYP) and cotyledonary (COT) explants. All treatments were

transferred to MS medium (MURASHIGE & SKOOG, 1962) basal salts supplemented with  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  nicotinic acid,  $10 \text{ mg L}^{-1}$  thiamine,  $1.2 \text{ mg L}^{-1}$  pyridoxine,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  myo-inositol, 3% (w:v) sucrose,  $300 \text{ mg L}^{-1}$  Timentin™ (SmithKline Beecham Farmacêutica),  $800 \text{ mg L}^{-1}$  PVP,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  arginine and solidified with 0.6% (w:v) agar (Sigma Chem. Co.), at pH  $5.7 \pm 0.1$ . In the first experiment, the explants were transferred to MS liquid medium containing  $100 \text{ mg L}^{-1}$  naphthaleneacetic acid (NAA) or  $100 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), for 4h. Three Petri dishes, with 22 explants per dish, composed each treatment. Initially, explants showing necrosis were not considered, and the frequency of explants presenting roots (FER) and the mean number of roots (NRE) were evaluated one month after the cultures were initiated.

In the following experiment, *Eucalyptus* plantlets were pre-treated for 24h into MS liquid media containing  $100 \text{ mg L}^{-1}$  of growth regulators: indolacetic acid (IAA), indolbutyric acid (IBA), NAA, 2,4-D, thidiazuron (TDZ), zeatin (ZEA), 6-benzylaminopurine (BAP), kinetin (KIN) (Sigma Chem. Co.), 3-(benzo[b]selenyl) acetic acid (BSAA) (Acros Organics). An additional control treatment in the absence of growth regulators was included. Concomitantly, other experiment was conducted where the concentrations of 10, 50 and  $100 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D, and the pulsing pre-treatment periods of 6, 12, 24 and 48h, were simultaneously evaluated. Each treatment held five Petri dishes with 11 to 15 plantlets per dish. The frequency of explants with epicotyl elongation (FEEE), frequency of explants showing more than 50% of oxidation (FEO), and the mean number of roots per explant (NRE) were evaluated one month after the cultures were initiated.

The experiments were conducted in a completely randomized design. Data were subjected to Cochran and Bartlett variance homogeneity and Lillifors normal distribution test. Appropriate mean test (Tukey), at 5% probability, and surface response analysis based on the average of the experiments were conducted by using the software Statistica 5.0.

## RESULTS AND DISCUSSION

Regardless 2,4-D or NAA 4h pre-treatment, whole plantlets lead to higher adventitious roots morphogenesis (Figure 1A). The higher number of adventitious roots observed on intact plantlets compared to isolated hypocotyls and cotyledonary explants did also confirm this observation (Figure 1B). Epicotyl elongation was inhibited with 24h pre-treatment in 100 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, TDZ or KIN, on the other hand, other growth regulators showed non-inhibitory results (Figure 2A), while BAP had a milder inhibitory influence on epicotyl elongation (Figure 3A). Somatic embryogenesis was not observed in any of the evaluated treatments. It is worth to mention that only average and standard deviations were performed for FER and FEEE (Figures 1A and 2A), as they did not support variance homogeneity by Cochran and Bartlett test at 1% probability (data not shown).

The negative effect of these pre-treatment was accompanied by an increasing necrosis/browning just in the growth regulator reverse order obtained for epicotyl elongation (Figures 2A and 2B). Similarly, both 2,4-D concentration and exposure period enhanced explant necrosis (Figure 4A). The consequences of high plant growth regulator doses is noticed as some growth regulators led to necrosis (Figure 3C), whereas TDZ and KIN allowed neither morphogenesis nor oxidation (Figure 2B).

It is important to note an increasing FEO with increasing pre-treatment periods and growth regulator concentrations (Figure 4A). Even though, investigating the concentration and exposure may result in different responses considering other pulsing periods, plant growth regulators or its combinations. Albeit higher necrosis compared to other auxins, 2,4-D did stimulated root hair development (Figure 3C).

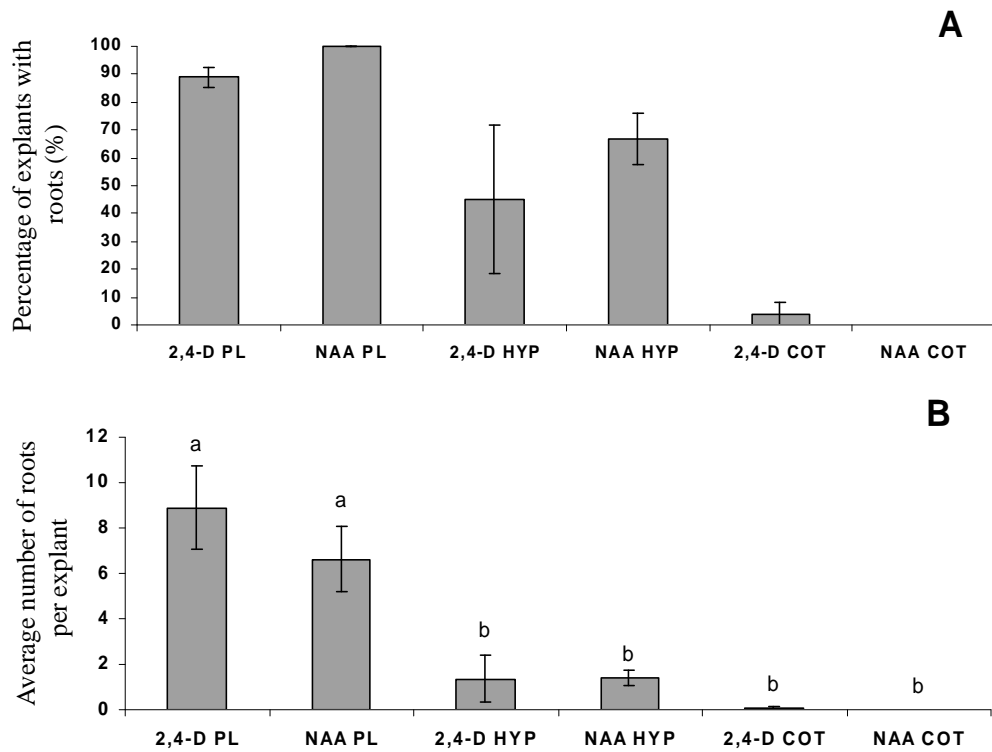
Epicotyl elongation (Figure 4B) and average number of roots per explant (Figure 4C) declined with the exposure and 2,4-D concentration, suggesting morphogenic

response dependence on these variables. Cytokinins, ZEA, BAP, TDZ and KIN, in the tested concentrations significantly inhibited rhizogenesis (Figure 2C), even compared to control treatment.

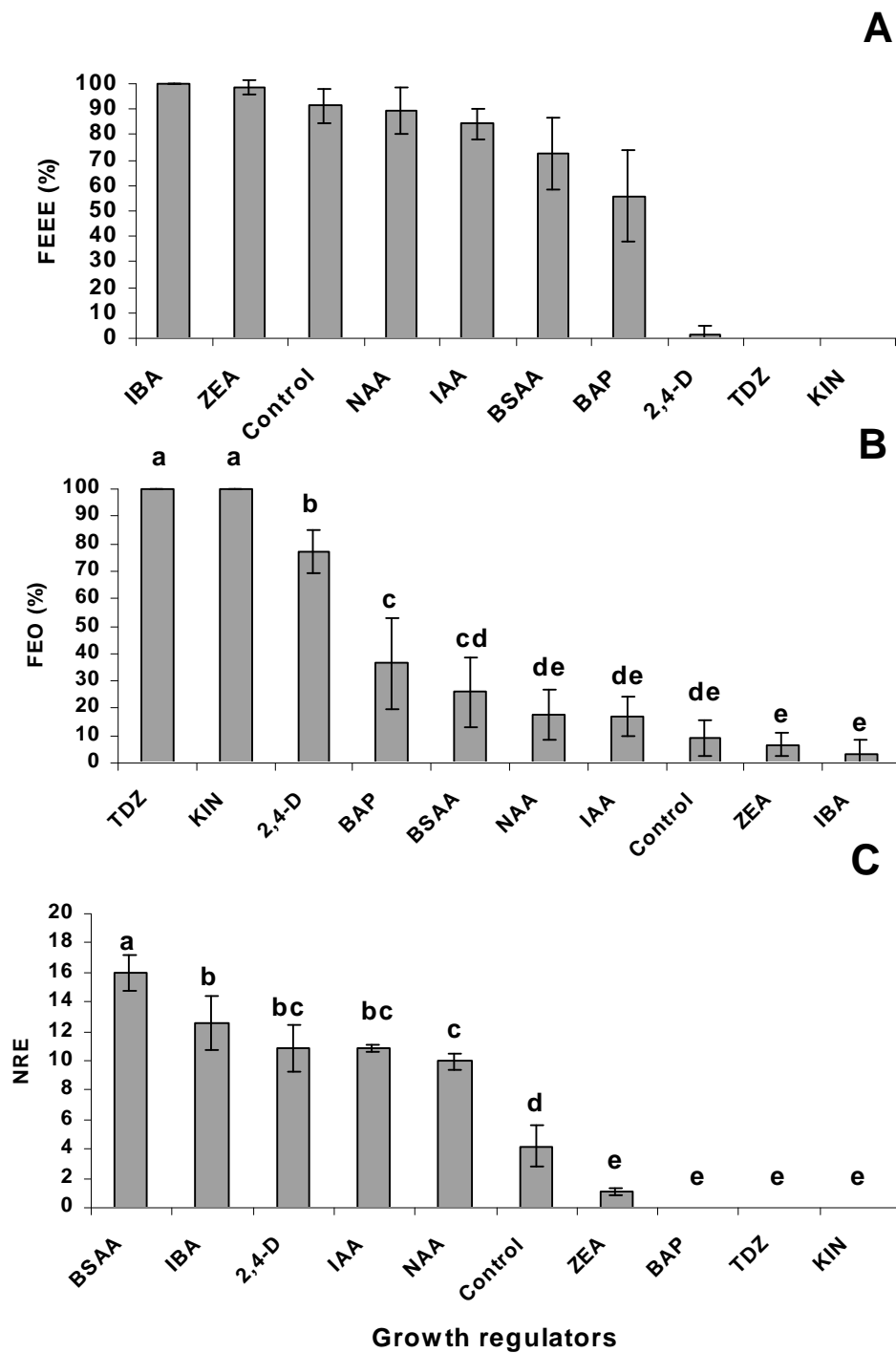
In contrast, the tested auxins, BSAA, IBA, 2,4-D, IAA and NAA, significantly stimulated this process (Figure 2C) compared to cytokinin or to the control treatments. The effect of BSAA is emphasized because it induced a significantly higher number of adventitious roots (Figures 3D and 2C), even considering IBA that is the most common auxin used for stimulating rhizogenesis in *Eucalyptus* (ASSIS & TEIXEIRA 1998).

Promising reports of this benzoseleniated auxin are highlighted in stimulating somatic embryogenesis (KEVERS et al., 2000) and rooting (KEVERS et al., 1999). Kevers et al. (2000) observed that 5 to 15 days on half-strength MS liquid medium supplemented with 3 mg L<sup>-1</sup> BSAA induced more embryos in *Panax ginseng* C. A. Mey explants than IAA for longer induction times, independently the auxin used. On the other hand, 0.24 mg L<sup>-1</sup> BSAA promoted greater rooting efficiencies as compared to other BSAA concentrations and other plant growth regulators like IAA and IBA (KEVERS et al., 1999). Even though the present treatments were not able to induce somatic embryos in eucalypt explants, a significant higher number of roots was observed, despite the fact that BSAA is still of potential application in eucalypt regeneration protocols. Further studies on the use of this growth regulator may result in favorable plant hormone ratios to shoot or embryogenic process.

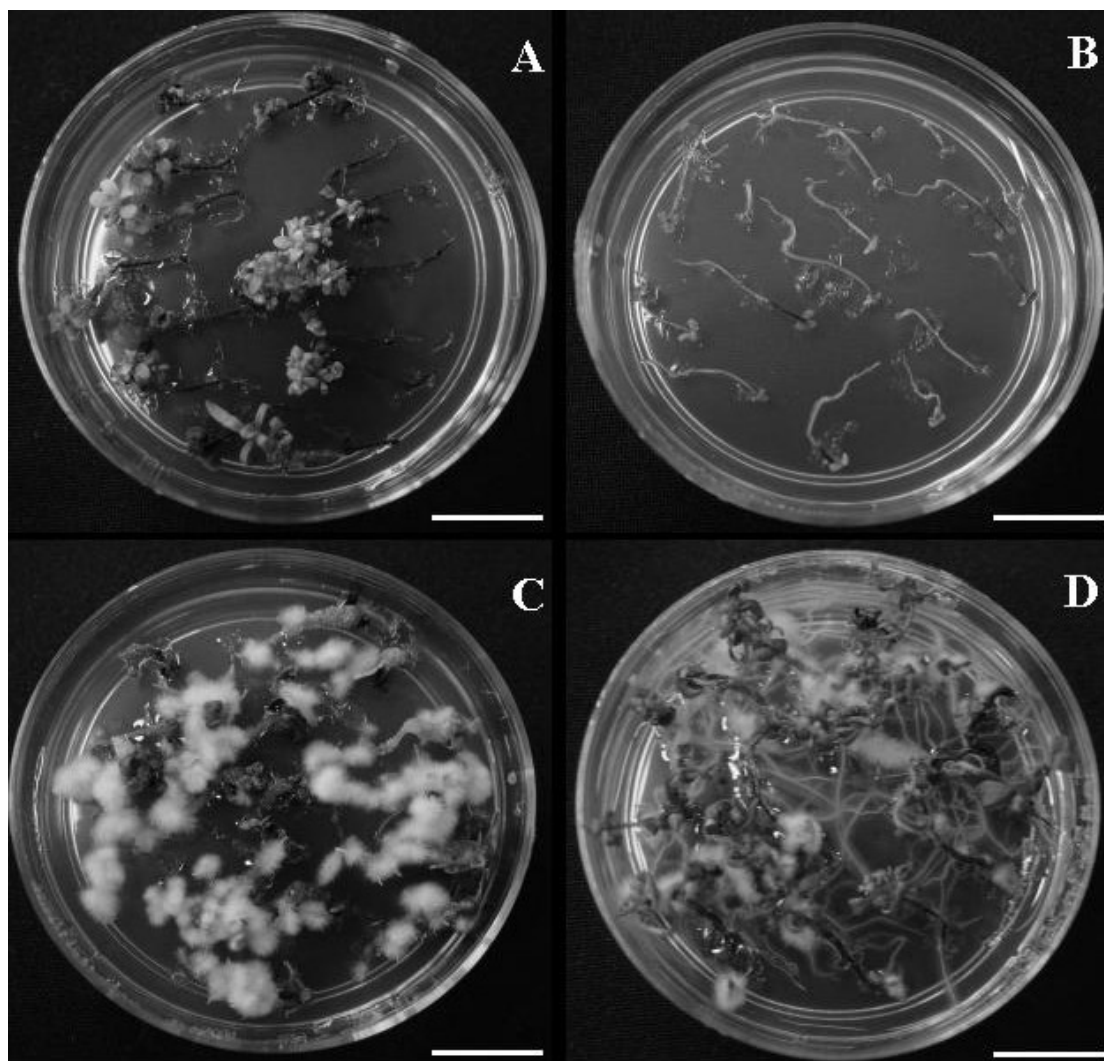
Eucalypt regeneration protocols display different explants sources as leaf (CID et al., 1999; WATT et al., 1991), seedlings (TERMIGNONI et al., 1996), cotyledon (BANDYOPADHYAY et al., 1999; CID et al., 1999; HARCOURT et al., 2000; NUGENT et al., 2001), cotyledonary nodes (CID et al., 1999) and hypocotyls explants (BANDYOPADHYAY et al., 1999; HARCOURT et al., 2000; NUGENT et al., 2001; TIBOK et al., 1995).



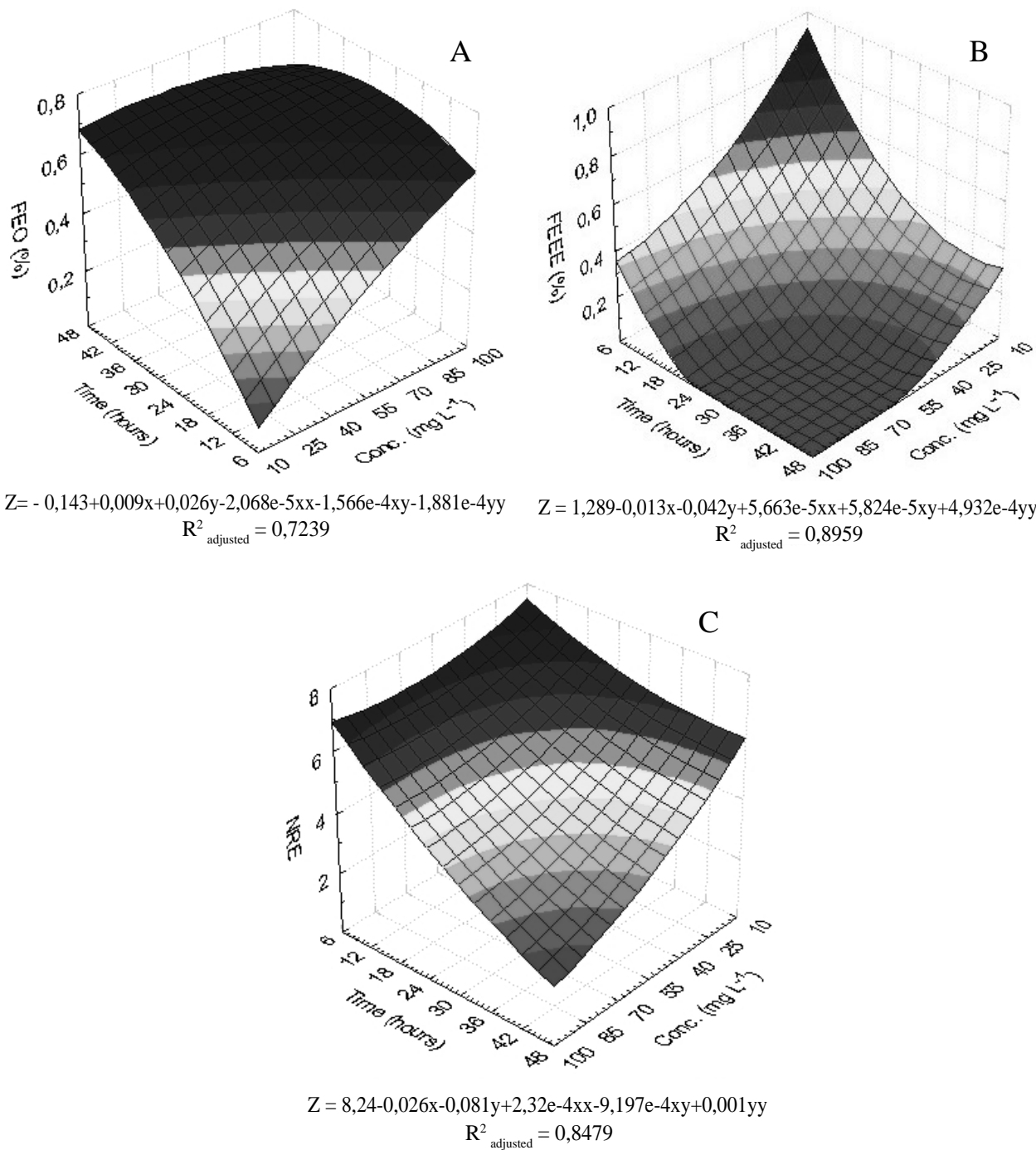
**FIGURE 1** – Influence of growth regulators on adventitious root morphogenesis in *Eucalyptus grandis* plantlets (PL), cotyledon (COT) and hypocotyl explants (HYP). **A** – Frequency of explants presenting adventitious roots, vertical bars correspond to the means per treatment and vertical lines to respective standard deviation, and **B** – Average number of roots per explant. Means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey 5%).



**FIGURE 2** – Influence of growth regulators 24h pre-treatment in *E. grandis* plantlets on shoot and adventitious root morphogenesis. **A** – Frequency of explants with epicotyl elongation (FEEE), **B** – Frequency of explants with more than 50% oxidation (FEO), and **C** – Average number of roots per explant (NRE). Means followed by the same letter do not differ significantly (Tukey 5%).



**FIGURE 3** – Effect of 24h growth regulators pre-treatment in *E. grandis* plantlets after 30 days on semi-solid regeneration medium. **A** – Pulsing with 100 mg L<sup>-1</sup> BAP, **B** – 100 mg L<sup>-1</sup> KIN, **C** – 100 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, and **D** – 100 mg L<sup>-1</sup> BSSA. (Bar = 1 cm).



**FIGURE 4** – Surface response analysis of the influence of 2,4-D concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ ) and pre-treatment periods (time – hours) in *E. grandis* plantlets shoot and adventitious root morphogenesis. **A** – Frequency of explants with more than 50% of oxidation (FEO), **B** – Frequency of explants with epicotyl elongation (FEEE), and **C** – Average number of roots per explant (NRE). All  $R^2$  were significant at 5% probability.



Besides examining the hormone content and relations in the explants, additional investigation on the explant source may provide other clarifying results as further explants, as calli (KEVERS et al., 2000) and root (KEVERS et al., 1999) did also respond to different growth regulators pulsing treatment. Additionally, direct and indirect embryogenesis was reported from apical meristems in papaya zygotic embryos (KOEHLER, 2004) and in pinus (MALABADI & STADEN, 2003).

This is an interesting approach to eucalypt as meristem disorganization concomitantly to root differentiation was observed with 2,4-D pulse treatment (Figure 3C), and because all auxins promoted direct rhizogenesis (Figures 3A, 3C and 3D). Additionally, callogenesis, rhizogenesis and embryogenesis on eggplant explants were observed depending only on NAA concentrations and periods of time onto the inductive medium (GLEDDIE et al., 1983). This is in agreement with the review by Fehér et al. (2002) review, which argued that stress responses to heavy metal, wounding, high salt and plant hormones concentration were related to induction of embryogenic competence.

In this respect, Jimenez & Bangerth (2001) demonstrated that in addition to distinct morphogenic responses, higher IAA levels in carrot hypocotyl explants declined just after sectioning, it being or not transferred to medium containing 2,4-D. After this initial decrease, explants cultured in a 2,4-D containing medium maintained a constant IAA level, whereas an increase was observed in the third evaluation for the explants cultured in a 2,4-D-free medium. Although the amount of gibberellins (GAs) in the explants decreased independently, differences on the abscisic acid and cytokinin levels were observed whether the presence or absence of 2,4-D.

It is worth to mention that most eucalypt regeneration reports employed auxins, 2,4-D and NAA, alone or in combination with other growth regulators, and that the explants were mostly maintained in induction medium (BANDYOPADHYAY et al., 1999; NUGENT et al., 2001; TIBOK et al., 1995; WATT et al., 1991). In addition to the auxin exogenous stimuli, its endogenous levels also

had significant role on the somatic embryos development (FEHÉR et al., 2002; MICHALCZUK et al., 1992). This is further consistent with Jimenez & Bangerth (2001) results, where, albeit no significant differences for GAs, zeatin and isopentenil adenine, extremely high differences on IAA and ABA levels among embryogenic and non-embryogenic carrot callus and suspension cultures were detected.

Basic questions on the mechanism of somatic embryo induction are related to the first cell division, where embryogenic cells are revealed to be small, with dense cytoplasm, and preferentially dividing asymmetrically, developing into embryo-like structures (FEHÉR et al., 2002). Similar characteristics were found in eucalypt (WATT et al., 1991). Accordingly, further approach on growth regulator pre-treatment may help establishing embryo and shoot regenerating protocols similarly to Cao et al. (2002) and Guerra et al. (2001). Nevertheless, the present results along with plant physiology understanding, and to genetic and environmental aspects of plant morphogenesis shall grant advances to propagation techniques and overcome limitations still present in eucalypt *in vitro* tissue culture.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Companhia Suzano Bahia-Sul for supporting the research on improvement of *Eucalyptus* regeneration and transformation protocols, held on Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno and Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II/BIOAGRO/UFV.

#### REFERENCES

- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 1998. v. 1, p. 261-296.
- BANDYOPADHYAY, S.; CANE, K.; RASMUSSEN, G.; HAMIL, J. D. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species: *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. **Plant Science**, New York, v. 140, p. 189-198, 1999.

- CAO, X.; HAMMERSCHLAG, F. A.; DOUGLASS, L. A two-step pretreatment significantly enhances shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry cv. Bruecrop. **HortScience**, Alexandria, v. 37, p. 819-821, 2002.
- CID, L. P. B.; MACHADO, A. C. M. G.; CARVALHEIRA, S. B. R. C.; BRASILEIRO, A. C. M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 56, p. 17-23, 1999.
- D'ONOFRIO, C.; MORINI, S. Simultaneous regeneration of different morphogenic structures from quince leaves as affected by growth regulator combination and treatment length. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 47, p. 321-325, 2004.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; ÖTVÖS, K.; MISKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in plant cells: a review. **Biologia**, Bratislava, v. 57, p. 5-12, 2002.
- GLEDDIE, S.; KELLER, W. A.; SETTERFIELD, G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and cell suspension of *Solanum melongena* (eggplant). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 61, p. 656-666, 1983.
- GUERRA, M. P.; DAL-VE스코, L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; REIS, M. S. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 13, p. 117-128, 2001.
- HARCOURT, R. L.; KYOZUKA, J.; FLOYD, R. B.; BATEMAN, K. S.; TANAKA, H.; DECROOQ, V.; LLEWELLYN, D. J.; ZHU, X.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. Insect and herbicide-resistant transgenic eucalypts. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 6, p. 307-315, 2000.
- JIMENEZ, V. M.; BANGERTH, F. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 111, p. 389-395, 2001.
- KEVERS, C.; JACQUES, P.; THONART, P.; GASPAR, T. *In vitro* root cultures of *Panax ginseng* and *P. quinquefolium*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 7, p. 173-178, 1999.
- KEVERS, C.; LE GAL, N.; MONTEIRO, M.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 31, p. 209-214, 2000.
- KOEHLER, A. D. **Embriogênese somática em mamoeiro (*Carica papaya* L.): anatomia, histoquímica e influência de ACC e STS e de pulsos de 2,4-D**. 2004. 72 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- MALABADI, R. B.; STADEN, J. van. Somatic embryos can be induced from the vegetative shoot apex of mature *Pinus patula* trees. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 69, p. 450-451, 2003.
- MICHALCZUK, L.; COOKE, T. J.; COHEN, J. D. Auxin levels at differing stages of carrot embryogenesis. **Phytochemistry**, Cambridge, v. 31, p. 1097-1103, 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NUGENT, G.; CHANDLER, S. F.; WHITEMAN, P.; STEVENSON, T. W. Adventitious bud induction in *Eucalyptus globulus* Labill. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, Cambridge, v. 37, p. 388-391, 2001.
- TERMIGNONI, R. R.; WANG, P. J.; HU, C. Y. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 45, p. 129-132, 1996.
- TIBOK, A.; BLACKHALL, N. W.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. **Plant Science**, New York, v. 110, p. 139-145, 1995.
- WATT, M. P.; BLAKEWAY, F.; CRESSWELL, C. F.; HERMAN, B. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. **Suid-Afrikaanse Bosboutydskrif**, Menlo Park, v. 157, p. 59-65, 1991.

# MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DO PORTA-ENXERTO DE VIDEIRA PAULSEN 1103 COM BENZILAMINOPURINA E ÁCIDO INDOLBUTÍRICO

## MULTIPLICATION OF PAULSEN 1103 GRAPEVINE ROOTSTOCK *IN VITRO* WITH BENZYLAMIMOPURINE AND INDOLACETIC ACID

MARCO ANTÔNIO KARAM LUCAS<sup>1</sup>, NORTON VICTOR SAMPAIO<sup>2</sup>, DENISE DIAS PEREIRA<sup>1</sup>,  
TANIRA GIMENEZ SAMPAIO<sup>3</sup>, GIOVÂNI SILVEIRA PERES<sup>3</sup>, JOELMA DUTRA FAGUNDES<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Engenheiro Agrônomo, MSc., URCAMP/INTEC – Rua Flores da Cunha, 310 – 96400-350 – Bagé, RS – promosem@alternet.com.br

<sup>2</sup>Engenheiro Agrônomo, Dr., URCAMP/INTEC – Rua Flores da Cunha, 310 – 96400-350 – Bagé, RS – promosem@alternet.com.br

<sup>3</sup>Bolsista de Iniciação Científica/CNPq, Agronomia/URCAMP – gsilveiraperes@bol.com.br

<sup>4</sup>Aluna do Curso de Ciências Biológicas da URCAMP.

### RESUMO

Os reguladores de crescimento desempenham papel importante na multiplicação *in vitro* de plantas, pois as respostas morfogênicas variam em função do tipo e da concentração desses reguladores. Neste trabalho, teve-se por objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido indolbutírico (AIB) na multiplicação do cultivar porta-enxerto de videira Paulsen 1103 (*Vitis vinifera* L.). Como explantes foram utilizados segmentos nodais de brotações contendo a segunda e a terceira gema a partir do ápice da brotação, com aproximadamente 1 cm de comprimento, sendo inoculados individualmente em tubos de ensaio. No experimento foi utilizado o meio MS, com metade da concentração de nutrientes minerais e vitaminas, sacarose (87,64 mM), mio-inositol (0,56 mM) e ágar (7g.L<sup>-1</sup>). Os tratamentos consistiram da combinação de diferentes concentrações de BAP (zero, 1,1 e 2,2 mM) e de AIB (zero e 1,0 mM). A ausência de BAP no meio de cultura resultou numa maior taxa de multiplicação, uma vez que as brotações apresentaram maior altura e número de gemas.

**Termos para indexação:** *Vitis vinifera*, BAP, AIB, micropropagação, cultura de tecidos.

### ABSTRACT

Growth regulators are important on *in vitro* plant multiplication based on the fact that plant morphogenetic responses change according to their type and concentration. The objective of this work was to evaluate shoot multiplication of grapevine rootstock Paulsen 1103 (*Vitis vinifera* L.) on different concentrations of BAP and IBA. Stem segments containing the second and third bud from the apex with approximately 1.0 cm length were used as explants. MS medium (half concentration of mineral nutrients and vitamins), sucrose (87.64 mM), myo-inositol (0.56 mM) and agar (7g L<sup>-1</sup>) with combinations of BAP (0, 1.1 and 2.2 mM) and IBA (0 and 1.0 mM) was used. The absence of BAP promoted a higher multiplication with higher shoots and bud number.

**Index terms:** *Vitis vinifera*, BAP, AIB, micropropagation, tissue culture.

### INTRODUÇÃO

O cultivar Paulsen 1103 é um porta-enxerto de videira (*Vitis vinifera* L.) vigoroso, resistente à filoxera (*Dactylosphaera vitifoliae*) e aos nematóides do gênero *Meloidogyne* spp (KUHN et al., 1996). É um dos principais porta-enxertos utilizados na viticultura brasileira, especialmente, em regiões de clima temperado.

Com a micropropagação, verifica-se vantagens em relação à estaquia, tradicionalmente utilizada para a propagação vegetativa da videira, dentre as quais se destacam a rapidez do processo e a possibilidade de obtenção de plantas matrizes livres de patógenos, principalmente, viroses (KRUL & MOWBRAY, 1984).

Os reguladores de crescimento são os principais fatores responsáveis pelo desencadeamento da morfogênese *in vitro*. Para multiplicação da videira, geralmente é utilizada a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP), que induz a formação de grande número de brotações e alta taxa de multiplicação, variando a concentração em função da cultivar (BIASI et al., 1998; HU & WANG, 1983; PEIXOTO et al., 1994).

A utilização de auxinas para a multiplicação da videira é bastante variável. De forma geral, utiliza-se meio de cultura sem auxinas (HARRIS & STEVENSON, 1982; HELOIR et al., 1997; LEE & WETZSTEIN, 1990). Com o emprego da auxina ácido naftalenoacético (ANA),

(Recebido em 01 de junho de 2004 e aprovado em 16 de setembro de 2005)

verificam-se resultados favoráveis no desenvolvimento da parte aérea para as cultivares Paulsen 1103 e RR-101-14 (PEIXOTO et al., 1994). Já para a cultivar Norton não foi verificado efeito desse regulador de crescimento (NORTON & SKIRVIN, 2001).

A auxina AIB é, freqüentemente, utilizada para induzir o enraizamento de explantes *in vitro* (CALDAS et al., 1998) e em alguns casos com a finalidade de promover o crescimento da parte aérea na etapa de multiplicação (HU & WANG, 1983). Trabalhos com a utilização de AIB na multiplicação foram realizadas com ameixeira (MORINI et al., 1991), pessegueiro (ALMEHDI & PARFITTI, 1986) e macieira (NUNES et al., 1999). Entretanto, não foram encontrados trabalhos utilizando AIB na multiplicação da videira.

Neste trabalho, teve-se por objetivo verificar os efeitos das concentrações de BAP e AIB na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de videira Paulsen 1103 com base em segmentos caulinares.

#### MATERIAL E MÉTODOS

No presente experimento foram utilizadas brotações de videira em sua quarta multiplicação em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com metade da concentração de nutrientes minerais e vitaminas, sacarose (87,64 mM), mio-inositol (0,56 mM), ágar (7g.L<sup>-1</sup>), sem reguladores de crescimento.

Os explantes selecionados constituíam-se de segmentos nodais, contendo a segunda e terceira gemas a partir do ápice das brotações do porta-enxerto Paulsen 1103, com tamanho aproximado de 1 cm.

O meio utilizado para a multiplicação foi o mesmo descrito acima, com a adição de BAP (zero, 1,1 e 2,2) e AIB (zero e 1,0) numa combinação fatorial. A esterilização do material foi realizada em autoclave a 1,0 kgf.cm<sup>2</sup> e 120 °C, durante 15 minutos. As condições da sala de crescimento foram de 24 ± 2 °C de temperatura, 14 horas de fotoperíodo e densidade de fluxo luminoso 40 µmol.cm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, e cada tratamento teve oito repetições de um explante, inoculados em tubos de ensaio com 5 ml de meio de cultura, tampados com folha de alumínio. A avaliação do experimento foi realizada após 45 dias, sendo utilizadas as seguintes variáveis: número de brotações total, número de brotações com tamanho igual ou superior a 1,0 cm, altura de brotações, número de gemas por brotação e intensidade de calo.

A altura de brotações foi medida a partir do colo até a folha apical. O número de gemas foi avaliado contando-se todas as gemas das brotações, inclusive a gema do ápice. A avaliação da intensidade de calo foi realizada por meio da atribuição de notas: 1 quando a base das brotações não apresentar calo, e as notas 2, 3 e 4 para calos com diâmetro, respectivamente, inferiores a 3 mm, entre 3 e 5 mm e superiores a 5 mm. O programa estatístico utilizado para análise dos dados foi o software Statistica (STATSOFT, 1998), tendo sido realizada a análise de variância do fator regulador de crescimento e o Teste de Duncan a 5% para os tratamentos.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na análise de variância para número de brotações totais e número de gemas por brotação, observou-se efeito altamente significativo somente para o BAP. Para altura de brotações, o efeito foi altamente significativo tanto para o BAP quanto para o AIB. Para intensidade de calo, ocorreu interação significativa para os dois reguladores de crescimento.

A adição de BAP na concentração de 2,2µM proporcionou maior número total de brotações (Tabela 1). Heloir et al. (1997) observaram o aumento do número de brotações da cultivar Pinot Noir com o aumento da concentração de BAP. Com a adição de AIB, não se verificou influência nesse parâmetro (Tabela 1). Para a cultivar Norton, concentrações entre 0 e 1,0 µM de ANA, também não influenciaram o número de brotações formadas (NORTON & SKIRVIN, 2001).

**TABELA 1** – Número total brotações, altura de brotações e número de gemas por brotação obtidas na multiplicação do porta-enxerto de videira Paulsen 1103 em diferentes concentrações de BAP e AIB - INTEC/URCAMP, 2005.

Reguladores de crescimento	Número total de brotações	Altura de brotações (cm)	Número de gemas por brotação
BAP ( $\mu\text{M}$ )			
0,0	1,06 c	2,52 a	4,09 a
1,1	1,75 b	1,17 b	2,80 b
2,2	2,62 a	0,94 b	2,69 b
AIB ( $\mu\text{M}$ )			
0,0	1,75 a	1,32 b	3,06 a
1,0	1,88 a	1,77 a	3,33 a

Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes, diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

O aumento da concentração de BAP resultou na redução da altura das brotações (Tabela 1). Resultado semelhante foi observado para o porta-enxerto RR101-14, no qual a maior altura foi verificada no tratamento sem BAP (PEIXOTO & PASQUAL, 1996). A redução da altura em decorrência do aumento da concentração de BAP foi constatada por Harris & Stevenson (1982). Lee & Wetzstein (1990) salientam que em elevados níveis de BAP, verifica-se inibição no crescimento das brotações.

Já com a adição de AIB, verificou-se aumento da altura de brotações (Tabela 1). Peixoto et al. (1994) observaram que a adição de uma auxina, no caso ANA, nos meios com diferentes concentrações de BAP, promoveu o crescimento da parte aérea das brotações dos porta-enxertos Paulsen 1103 e RR101-14.

Maior número de gemas foi observado no tratamento sem BAP (Tabela 1). O maior crescimento das brotações nesse tratamento permitiu o aparecimento de maior número de gemas. Schwengber et al. (1999) obtiveram maior número de gemas por brotação do porta-enxerto de macieira Mark com a utilização de BAP em relação ao meio sem citocinina. O AIB não teve nenhum efeito sobre essa variável (Tabela 1).

O número de brotações maiores que 1,0 cm não foi influenciado pela adição de BAP ou AIB (Tabela 2). A redução no tamanho das brotações com o aumento da

concentração de BAP foi verificada por Norton & Skirvin (2001). O fato de não ter sido constatada diferença entre as concentrações de BAP para essa variável, provavelmente, se deve às concentrações de BAP empregadas no presente trabalho. Peixoto et al. (1994) utilizaram BAP entre 0 e 8,8 mM e verificaram que em concentrações superiores a 2,2 mM ocorre uma menor formação de brotações maiores que 1,0 cm.

No tratamento em que não foi adicionado o BAP, verificou-se uma maior taxa de multiplicação em relação aos meios com BAP, pois embora não tenha diferido no número de brotações maiores que 1 cm, a brotação formada teve maior altura e número de gemas, podendo ser dividida em dois novos explantes, ao passo que nos tratamentos com BAP, ocorreu apenas a formação de um novo explante a partir da brotação formada.

Nos tratamentos sem BAP, ocorreu menor intensidade de calo (Tabela 3). A combinação de 1,1 mM BAP e 1,1 mM AIB e os tratamentos com 2,2 mM BAP com e sem AIB resultaram na maior formação de calos. A formação de calo na base das brotações é ocasionada pela utilização de citocininas e/ou auxinas, como foi constatado nos trabalhos de Biasi et al. (1998) e Heloir et al. (1997), em que a formação de calo somente ocorreu quando citocininas ou auxinas foram adicionadas ao meio de cultura e a sua intensidade é maior com o aumento das concentrações dessas substâncias.

**TABELA 2** – Número brotações maiores que 1 cm obtidas na multiplicação do porta-enxerto de videira Paulsen 1103 em diferentes concentrações de BAP - INTEC/URCAMP, 2005.

Reguladores de crescimento	Número de brotações maiores que 1 cm
BAP ( $\mu\text{M}$ )	
0,0	1,06 a
1,1	0,94 a
2,2	1,44 a
AIB ( $\mu\text{M}$ )	
0,0	0,92 a
1,0	1,38 a

Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

**TABELA 3** – Intensidade calo obtidas na multiplicação do porta-enxerto de videira Paulsen 1103 em diferentes concentrações de BAP e AIB - INTEC/URCAMP, 2005.

BAP/AIB( $\mu\text{M}$ )	Intensidade calo
0,0/0,0	1,00 a
0,0/1,0	1,25 a
1,1/0,0	2,63 b
1,1/1,0	3,63 c
2,2/0,0	3,88 c
2,2/1,0	4,00 c

Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes, diferem estatisticamente pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Os resultados encontrados com emprego de BAP neste trabalho estão de acordo com os observados na literatura, pois as respostas morfológicas, como número total e altura de brotações, número de brotações com altura superior a 1cm, número de gemas por brotação e intensidade de calo dependem diretamente da concentração empregada de BAP (BARBOSA et al., 1993; SCHUCH & PETERS, 1993).

As citocininas são substâncias que regulam a atividade das ciclinas. Essas proteínas controlam a divisão celular vegetal. O aumento da concentração de BAP até um determinado limite tende a aumentar o número de brotações, pois os meristemas pré-existentes nos explantes são estimulados a se desenvolver. A presença de citocininas no meio também pode induzir à formação e o desenvolvimento de meristemas adventícios nos explantes. Da mesma forma que no caso do desenvolvimento de brotações, a multiplicação das células nas regiões danificadas do explante, no caso a região basal, é estimulada pelo BAP. A redução na altura

das brotações com o uso de BAP se deve ao fato de que, na presença da citocinina, existe um maior direcionamento dos componentes do meio de cultura para formação de um maior número de brotações em detrimento do desenvolvimento da altura das brotações (KIEBER, 2004; PERES & KERBAUY, 2004).

O aumento da altura de brotações em decorrência da utilização de AIB está de acordo com o papel desempenhado pelas auxinas no processo de expansão celular e, conseqüentemente, no aumento da altura das plantas. As auxinas atuam no aumento da extensibilidade da parede celular, pela ativação de enzimas  $\text{H}^+$ -ATPase presentes na membrana plasmática, que bombeiam prótons  $\text{H}^+$  do citosol para parede celular. A redução do pH estimula a atividade das enzimas denominadas expansinas. Essas enzimas atuam no afrouxamento da parede celular rompendo as pontes de hidrogênio entre os polissacarídeos que compõem a parede celular (MERCIER, 2004; MURPHY, 2004).

## CONCLUSÕES

Pelos resultados, permite-se concluir, para a multiplicação da cultivar de videira Paulsen 1103, o seguinte:

- meios de cultura sem BAP permitem a obtenção de uma maior taxa de multiplicação;
- a adição de BAP ao meio de multiplicação não influencia o número de explantes maiores que 1 cm, adequados para novas etapas de proliferação;
- o AIB aumenta a altura das brotações formadas;
- a intensidade de calo, na base das brotações, é menor nos meios sem BAP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEHDI, A. A.; PARFITTI, D. E. *In vitro* propagation of peach: I. propagation of Lovell and Nemaguard peach rootstocks. **Fruit Varieties Journal**, [S.l.], v. 40, n. 1, p. 12-17, 1986.
- BARBOSA, M. H. P.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P.; ARELLO, E. F.; BARROS, I. de. Efeitos da Benzilaminopurina e do Ácido Indole-3-Acético sobre a propagação *in vitro* de *Gerbera Jamesonii* Bolus Ex.Hook c. Appelbloesem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 15-19, 1993.
- BIASI, L. A.; PASSOS, I. R. da S.; POMMER, C. V. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de videira através de ápices meristemáticos e segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 10, p. 1587-1594, 1998.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. p. 86-132.
- HARRIS, R. E.; STEVENSON, J. H. *In vitro* propagation of *Vitis*. **Vitis**, [S.l.], n. 21, p. 22-32, 1982.
- HELOIR, M. C.; FOURNIOUX, J. C.; OZIOL, L.; BESSIS, R. Na improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Pinot Noir) using axillary-bud microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, n. 49, p. 223-225, 1997.
- HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shot tip, and bulb cultures. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1983. v. 1, p. 177-227.
- KIEBER, J. Citocininas: reguladores da divisão celular. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. (Eds.). **Fisiologia vegetal**. PortoAlegre: Artmed, 2004. p. 518-540.
- KUHN, G. B.; LOVATEL, J. L.; PREZOTTO, O. P.; RIVALDO, O. F.; MANDELLI, F.; SÔNEGO, O. R. **O cultivo da videira: informações básicas**. 2. ed. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPV, 1996. 60 p.
- KRUL, W. R.; MOWBRAY, G. H. Grapes. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1984. cap. 6, p. 396-434.
- LEE, N.; WETZSTEIN, Y. *In vitro* propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 2, p. 324-329, 1990.
- MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 217-249.
- MORINI, S.; TRINCI, M.; ZACCHINI, M. Effect of different photoperiods on *in vitro* growth of Mr.S.2/5 plum rootstock. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, n. 25, p. 141-145, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, n. 15, p. 473-497, 1962.
- MURPHY, A. Auxina: o hormônio de crescimento. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. (Eds.). **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 449-484.
- ORTON, M. A.; SKIRVIN, R. M. Micropropagation of "Norton" Winigrape. **Hortotechnology**, [S.l.], v. 11, n. 2, p. 206-208, 2001.
- NUNES, J. C. de O.; BARPP, A.; SILVA, F. C.; PEDROTTI, E. L. Micropropagação do porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia*) a partir da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 21, n. 2, p. 191-195, 1999.

PEIXOTO, P. H. P.; PASQUAL, M. Influência da origem dos explantes na multiplicação e no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de videira. **Ciência e Agrotécnica**, [S.l.], v. 20, n. 3, p. 301-306, 1996.

PEIXOTO, P. H. P.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; ALVARENGA, A. A. Enraizamento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 16, n. 1, p. 178-184, 1994.

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. Citocininas. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 250-278.

SCHUCH, M. W.; PETERS, J. A. Multiplicação *in vitro* de brotações de macieira cultivares Marubakaido (*Malus prunifolia*) e Megumi (*Malus domestica*, Borkh). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 433-437, 1993.

SCHWENGBER, J. E.; RODRIGUES, A. C.; RUFATO, L.; FORTES, G. R. de L. Efeito de diferentes concentrações de BAP e TDZ na multiplicação de microestacas do porta-enxerto de macieira Mark. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 21, n. 2, p. 200-203, 1999.

STATSOFT. **Statistica for Windows**: computer program manual. Tulsa, 1998.



# AVALIAÇÃO DA CONSISTÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CAPIM-ELEFANTE (*Pennisetum purpureum* Schum.)<sup>1</sup>

## EVALUATION OF CULTURE MEDIUM CONSISTENCIES ON PROLIFERATION OF *IN VITRO* PROPAGATED ELEPHANTGRASS (*Pennisetum purpureum* Schum.)

MARINES MARLI GNIECH KARASAWA<sup>2</sup>, JOSÉ CARDOSO PINTO<sup>3</sup>, ANTÔNIO VANDER PEREIRA<sup>4</sup>,  
JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Parte integrante da Dissertação de Mestrado intitulada “Revigoramento de cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) submetidas à termoterapia e cultura de tecidos.

<sup>2</sup>Engenheira Agrônoma, Mestre em Zootecnia – Forragicultura e Pastagens – Av. Pádua Dias, 11 – 13418-970 – Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas – ESALQ/USP – mmgkaras@esalq.usp.br.

<sup>3</sup>Engenheiro Agrônomo – Professor Adjunto IV – Bolsista do CNPq – 37200-000

<sup>4</sup>Engenheiro Agrônomo, Doutor – Embrapa de Gado de Leite – 36038-330 – Juiz de Fora, MG.

<sup>5</sup>Engenheiro Agrônomo – Professor Titular, PhD – Bolsista CNPq – 37200-000 – 37200-000.

### RESUMO

Objetivo-se com este estudo definir a consistência do meio de cultura que proporciona o maior número de brotos, raízes e altura do explante para propagação *in vitro* das cultivares Mineiro e Pioneiro de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). Foram utilizados explantes secundários, obtidos por cultura de meristemas, individualizados com 30 mm de comprimento e transferidos para o meio básico MS, suplementado com as vitaminas WPM, 3% de sacarose e 4,44 e 8,88 µM de BAP, para as cultivares Mineiro e Pioneiro, respectivamente. Os tratamentos foram diferentes consistências do meio de cultura, sendo utilizado meio de cultura líquido, com 0,7% de ágar e 0,2% de Phytigel®. As avaliações foram realizadas durante 49 dias. A evolução do número de brotações e de raízes por explante nas cultivares Mineiro e Pioneiro foram semelhantes durante as sete semanas de avaliação, sendo encontrado maior número no meio de cultura contendo Phytigel®, intermediário no meio suplementado com ágar e inferior no meio líquido. Por outro lado, o crescimento em altura, das cultivares estudadas, foi semelhante durante as sete semanas para todos os meios de cultura testados. Ao final da sétima semana, o maior número de brotações, foi no meio de cultura suplementado com 0,7% de ágar e 0,2% de Phytigel®. A maior produção de raízes foi no meio de cultura suplementado com 0,2% de Phytigel®. Para o crescimento do explante em altura, não foi verificado nenhum efeito significativo para os fatores avaliados.

**Termos para indexação:** *Pennisetum purpureum*, cultura de tecidos, micropropagação, forrageiras.

### ABSTRACT

The objective this study was to define the consistency of the culture medium that promotes the highest number of shoot and roots and explant height, for their *in vitro* propagation of “Mineiro” and “Pioneiro” elephant grass (*Pennisetum*

*purpureum* Schum.) cultivars. Secondary (30 mm long) elephant grass explants, obtained through meristem culture, were transferred to a basic MS medium, supplemented with WPM vitamins, 3% sucrose and 4.44 and 8.88 mM benzylaminopurine (BAP), for the cultivars Mineiro and Pioneiro, respectively. The treatments consisted of three different consistencies of culture medium (liquid, with 0.7% agar and 0.2% Phytigel®). The evaluations were conducted during 49 days. The number of shoots and roots per explant for both cultivars were similar during the seven weeks of evaluation. Higher number of shoots and roots were obtained in culture medium supplemented with Phytigel®, intermediate with agar and lowest with liquid medium. On other hand, for explant growth in height the studied cultivars were similar during the tested period in all used medium. At end of the seventh week of culture, higher number of shoot was observed on culture medium supplemented with 0.7% agar and 0.2% Phytigel®. The highest production of roots occurred in culture medium supplemented with 0.2% Phytigel®. For the explant growth in height, no significant effect was verified for any of the factors evaluated.

**Index terms:** *Pennisetum purpureum*, tissue culture, micropropagation, forrage.

### INTRODUÇÃO

A micropropagação, por meio do cultivo de meristemas *in vitro*, tem sido muito utilizada na cultura de tecidos objetivando a propagação clonal, preservação de germoplasma e a eliminação de contaminações causadas por patógenos como vírus, fungos endofíticos, bactérias e micoplasmas, adquiridos durante a propagação assexuada (KARTHA, 1986; NEHRA & KARTHA, 1994).

(Recebido em 01 de outubro de 2004 e aprovado em 20 de outubro de 2005)

Para que o crescimento, a proliferação e a manutenção dos explantes *in vitro* sejam bem sucedidos, torna-se necessário o estabelecimento de uma metodologia de multiplicação, em que sejam definidas as quantidades adequadas dos elementos necessários, no meio de cultura, especificamente, para cada espécie ou cultivar. O meio de cultura deve suprir os tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com macro e micronutrientes e carboidratos que forneçam energia e carbono para a biossíntese de aminoácidos, proteínas, polissacarídeos estruturais e todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento das células. A consistência física do meio de cultura também exerce efeito fundamental na morfogênese e no crescimento das brotações, podendo causar sérios transtornos no desenvolvimento esperado do explante se as suas exigências básicas não forem atendidas. Em geral, os explantes são mantidos em meio sólido, usualmente suplementado com 0,6 a 0,8% de ágar (CONSTABEL & SHYLUK, 1994) e gelrite, ambos polissacarídeos complexos (THORPE, 1994). No entanto, para algumas culturas, o meio líquido, com ou sem agitação, tem proporcionado melhores resultados.

Cada cultura, quando submetida a uma mesma composição de meio de cultura, alterando-se apenas a sua consistência física, pode apresentar comportamento completamente distinto sobre a taxa de crescimento de um explante (GEORGE, 1993). O meio de cultura solidificado com ágar poderá causar problemas na morfogênese de certas culturas devido à presença de substâncias inibidoras em sua composição que poderão diminuir a taxa de crescimento e aumentar a presença de exsudatos próximos aos explantes. Também pode ficar aderido às raízes, causando transtorno na lavagem dessas substâncias antes do transplante no solo. Os géis, por sua vez, são gomas que resistem à degradação enzimática, não são tóxicas e têm promovido respostas superiores em muitas culturas herbáceas, em comparação ao meio de cultura suplementado com ágar (CALDAS et al., 1990). Por outro lado, o meio de cultura

líquido pode, às vezes, ajudar a resolver alguns problemas encontrados nos meios solidificados como o acúmulo de exsudatos fenólicos, folhas marrons ou baixo crescimento. Normalmente, as culturas em meio líquido devem ser aeradas pela agitação ou outro processo, porém quando os explantes tiverem tamanho igual ou superior a 2,5 cm de comprimento a sua base pode ser imersa em meio líquido, não sendo mais necessária a agitação, pois a parte superior fica exposta ao ar (KYTE & KLEYN, 1996).

Em dados da literatura, verifica-se que o sucesso no cultivo *in vitro* pode estar condicionado à natureza física do meio de cultura. Mellor & Stace-Smith (1969) obtiveram o melhor resultado em meio de cultura líquido, em relação ao sólido, na cultura de meristemas de batata. Para Coelho (1999), o meio de cultura líquido foi mais favorável que o ágar, ágar lavado e o Phytigel® para o desenvolvimento de embriões de sucupira branca. Hammerschlag (1988) verificou crescimento superior com pêssego no meio de cultura líquido, enquanto Lee et al. (1986) obtiveram o maior número de raízes por explantes de *Liquidambar styraciflua* L. em meio líquido. Por outro lado, Bhagyalakshmi & Singh (1988) constataram maior eficiência do meio sólido no cultivo de *Zingiber officinale* Rosc.. Já Finch et al. (1992) verificaram comportamento diferenciado para espécies de arroz, dos quais o Phytigel® proporcionou os melhores resultados para *Oryza longistaminata* A. Chev. & Roehrich., *O. rufipogon* Griff. e *Leersia perrieri* (A. Camus) Launert., o meio contendo agarose apresentou melhores brotações em *Leptochloa fusca* (L.) Kunth. e *O. officinalis* Wall., e o meio suplementado com ágar mostrou resultado superior em *O. granulata* Nees.

Objetivou-se com este trabalho, definir a consistência física do meio de cultura, com concentração pré-definida de benzilaminopurina (KARASAWA et al., 2002), que proporciona o maior número de brotações, número de raízes e altura do explantes *in vitro* das cultivares Mineiro e Pioneiro de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.).

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, no período de julho de 1999 a setembro de 2000.

Para a condução dos experimentos, utilizaram-se meristemas apicais de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) cvs. Mineiro e Pioneiro, submetidas ao tratamento da termoterapia, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-Elefante (BAGCE) da Embrapa Gado de Leite, Coronel Pacheco – MG. Os colmos obtidos no BAGCE foram fracionados em estacas com 3 a 4 gemas e plantados em sacos plásticos com 5 litros de solo cada uma na segunda quinzena de julho de 1999 e conduzidos até suas brotações atingirem 20 cm. Uma vez atingida a altura mínima, foi iniciado o tratamento da termoterapia na casa-de-vegetação da Embrapa Gado de Leite, cuja temperatura ambiental foi controlada, variando em torno de 30 e 45°C (noite e dia, respectivamente). O tratamento da termoterapia, realizado para eliminação de vírus do tecido meristemático, foi conduzido por um período de 20 dias, após o qual foram coletados os 20 cm superiores da planta, contendo os meristemas apicais, que foram preparados para a desinfestação.

O preparo do material consistiu na retirada de 75% das lâminas foliares, e a sua submersão em solução de hipoclorito de sódio 1%, sendo agitado por 20 minutos e, depois enxaguado três vezes com água destilada estéril em ambiente asséptico. Com auxílio de microscópio estereoscópico, em capela de fluxo de ar laminar, os meristemas apicais foram retirados e inoculados em tubos de ensaio, de 25 x 150 mm, contendo 15 ml do meio de cultura.

Inoculado o meristema, o frasco foi fechado e levado para a sala de crescimento, onde foi mantido sob condições de iluminação de 2000 lux e temperatura constante de 25±2°C. O material que se desenvolveu em meio de cultura foi multiplicado até atingir o número de plantas necessário para uma posterior avaliação.

Explantos secundários individualizados, com 3 cm de comprimento, foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com vitaminas do meio WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980) e 3% de sacarose, sendo utilizados meios de cultura líquido, sólido com 0,7% de ágar Sigma® ou com 0,2% de Phytigel® e suplementados com 4,44 e 8,88 mM de BAP, respectivamente, para as cultivares Mineiro e Pioneiro conforme definido por Karasawa (2001) e Karasawa et al. (2002), como sendo a melhor concentração para a multiplicação desses cultivares. O pH do meio foi corrigido para 5,7±0,1. Os tubos foram fechados e autoclavados a 120°C, um dia antes da inoculação. No meio líquido, os explantes tinham como suporte pontes feitas com papel de filtro.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com cinco repetições, sendo os tratamentos dispostos em um esquema fatorial 2 x 3 (PETERSEN, 1994), consistindo de duas cultivares (Mineiro e Pioneiro) e três tipos de consistências de meio de cultura (líquido, solidificado com ágar e solidificado com Phytigel®). Cada parcela foi constituída por três tubos de ensaio, com um explante/tubo.

Foram avaliados o número de brotações, raízes e altura dos explantes a cada sete dias durante sete semanas, totalizando 49 dias, sendo assim considerado o incremento do número de brotações, número raízes e altura dos explantes. Para avaliar a melhor consistência do meio de cultura foram tomados resultados das médias finais aos 49 dias para cada meio e cada cultivar estudada.

Os dados dos parâmetros avaliados foram analisados pelo programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2000), utilizando-se os esquemas tradicionais de análise de variância. Quando houve efeito significativo de consistência de meio, usou-se o teste de F para comparar as cultivares e, quando houve efeito para os tipos de consistências do meio de cultura, utilizou-se o teste de Scott-Knott.

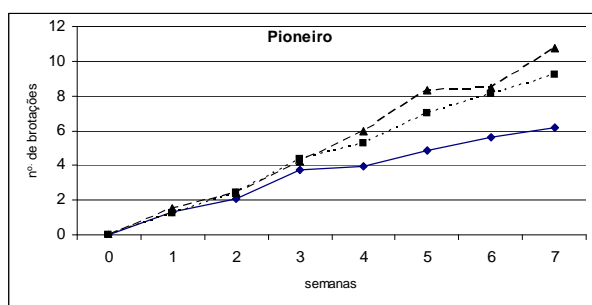
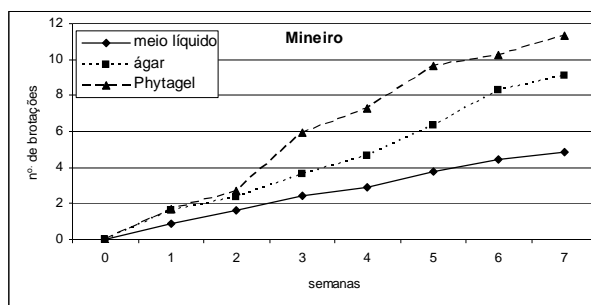
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento no número de brotações (Figura 1) ocorreu de forma gradual, para ambas as cultivares estudadas, ao longo de 49 dias, não sendo possível prosseguir o estudo após esse período devido à senescência do material. Verificou-se que o meio de cultura contendo Phytigel® apresentou um número de brotações superior para todas as avaliações a partir da segunda avaliação na cv. Mineiro, e a partir da quarta avaliação na cv. Pioneiro. O meio de cultura suplementado com ágar mostrou-se intermediário ao passo que o meio líquido apresentou os menores valores em todo o período de avaliação.

Ao final das avaliações, o meio de cultura líquido apresentou número de brotos por explante inferior ( $P < 0,05$ ) aos meios contendo ágar e Phytigel®, nas cvs. Mineiro e Pioneiro, dos quais os dois últimos não diferiram entre si (Tabela 1). As cultivares Mineiro e Pioneiro apresentaram 9,13 e 11,33, e 9,20 e 10,73 brotos/explante, após 49 dias, respectivamente, em ágar e Phytigel® na concentração de  $4,44 \mu\text{M}$  de BAP para a cv. Mineiro e de  $8,88 \mu\text{M}$  de BAP para a cv. Pioneiro. Pelos resultados deste estudo, verificou-se uma melhor adaptação do capim-elefante ao meio de cultura sólido, em relação ao meio líquido. Esse comportamento pode ser explicado com base em um possível excesso de umidade do meio de cultura líquido em relação aos meios sólidos, ou pelo potencial osmótico

menos negativo do meio líquido em relação aos meios solidificados com ágar e Phytigel®, ocasionando maior perda de água da célula e promovendo assim um estresse osmótico (GEORGE, 1993) ou ainda por excesso de macro e micronutrientes, já que o meio líquido possuía a mesma quantidade do meio sólido. Caldas et al. (1990) alertam que, possivelmente, o meio de cultura líquido necessita menores quantidades de macro e micronutrientes pelo fato de o gradiente desses elementos se estabelecer mais facilmente em relação às necessidades nutricionais da planta. Os valores obtidos para o número de brotações ao final deste estudo foram superiores aos de Zanette et al. (1988) que, utilizando a técnica da micropropagação por cultura de meristemas no capim-elefante variedade Napier, obtiveram apenas oito brotos de capim-elefante na concentração de  $4,44 \mu\text{M}$  de BAP após 25 e 35 dias.

A produção de raízes (Figura 2) até a quarta semana foi semelhante para ambas as cultivares. A partir de então foram verificados incrementos expressivos no meio contendo Phytigel®, indicando uma possível escassez de nutrientes minerais, pois ao se analisarem o aumento do número de brotações e o crescimento em altura, verificou-se crescimento constante. Esse comportamento fisiológico de estimular a produção de raízes é comum em plantas sempre que ocorre algum tipo de escassez no substrato. Os meios líquido e suplementado com ágar apresentaram uma mesma tendência para número de brotos



**FIGURA 1** – Evolução do número de brotações de capim-elefante cvs. Mineiro e Pioneiro, durante os 49 dias, em função da consistência do meio de cultura. Lavras, UFLA, 2005.

e para o crescimento em altura, no entanto o estímulo para o sistema radicular do meio de cultura líquido foi muito menor, para ambas as cultivares, possivelmente isso foi devido ao estresse pelo excesso de umidade, no caso do meio líquido, e à presença de produtos tóxicos para a raiz, no caso do meio contendo ágar (CALDAS et al., 1990). Esse fato é importante, pois demonstra que a propagação *in vitro* poderá ser seriamente afetada quanto à proliferação de brotações laterais pela inibição do sistema radicular o qual impede a absorção dos nutrientes minerais do meio de cultura.

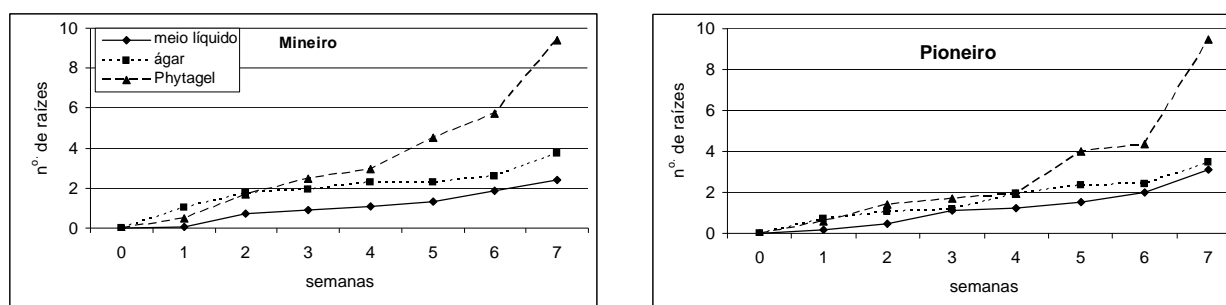
Ao final das avaliações, a produção de raízes nas cvs. Mineiro e Pioneiro foi semelhante, e os meios de cultura líquidos e o suplementado com ágar tiveram produção bastante inferior em relação ao meio de cultura contendo Phytigel® (Tabela 2). Houve diferença significativa entre

os números de raízes dos meios de cultura líquido e suplementado com ágar, em relação ao meio de cultura suplementado com Phytigel®. Como o Phytigel® é uma goma que não contém substâncias tóxicas em sua composição (CALDAS et al., 1990), justifica-se a obtenção dos melhores resultados na produção de raízes. Uma vantagem verificada nesse processo é que, mesmo quando submetido a concentrações de BAP, ocorre a formação de número satisfatório de raízes. Sabe-se que o BAP é uma citocinina cujas principais características são a quebra da dominância apical e a inibição da formação de raízes, tornando necessário, para a maioria das culturas, a sua eliminação do meio de cultura e, às vezes ainda, a inclusão de reguladores de crescimento que estimulem a formação de raízes. Zanette et al. (1988) também avaliaram a emissão

**TABELA 1** – Número de brotações por explante de capim-elefante, provenientes das cvs. Mineiro e Pioneiro em função da consistência do meio de cultura. Lavras, UFLA, 2005.

Consistência do meio de cultura	Número de Brotações/Explante	
	Cv. Mineiro	Cv. Pioneiro
Líquido	4,86 Ba	6,20 Ba
Ágar	9,13 Aa	9,20 Aa
Phytigel®	11,33 Aa	10,73 Aa
CV (%)	23,80	

Médias seguidas por letras diferentes, maiúscula na coluna, (Teste de Scott-Knott, 5%) e minúscula na linha, (Teste de F, 5%) diferem entre si.



**FIGURA 2** – Evolução do número de raízes dos explante de capim-elefante cvs. Mineiro e Pioneiro, durante os 49 dias, em função da consistência do meio de cultura. Lavras, UFLA, 2005.

de raízes na variedade Napier e obtiveram 85% de enraizamento, entretanto não citam o número de raízes por explante. O resultado foi inferior ao obtido neste trabalho, no qual 100% dos explantes apresentaram raiz de morfologia e ramificação normais.

O crescimento em altura dos explantes das cvs. Mineiro e Pioneiro de capim-elefante (Figura 3) mostrou-se semelhante durante todas as avaliações, para os três tipos de meio de cultura. Aparentemente a forma física do meio não afetou o crescimento em altura dos cultivares.

Na avaliação final as alturas dos explantes das cvs. Mineiro e Pioneiro de capim-elefante mostraram-se semelhantes ( $P < 0,05$ ) em todos os tipos de substratos estudados (Tabela 3). Pode-se observar que os explantes da cv. Mineiro cresceu, em média, 1,80 cm e os da cv. Pioneiro, 1,54 cm, em 49 dias, o que foi considerado pouco, pois o material foi inoculado com 3,0 cm. Possivelmente,

isso ocorreu pela presença da citocinina BAP nas concentrações de 4,44 e 8,88 M, para as cvs. Mineiro e Pioneiro, respectivamente. As concentrações utilizadas foram determinadas em estudo anterior e consideradas ideais para se obter um maior rendimento de brotações para cada uma dos cultivares (KARASAWA, 2001; KARASAWA et al., 2002).

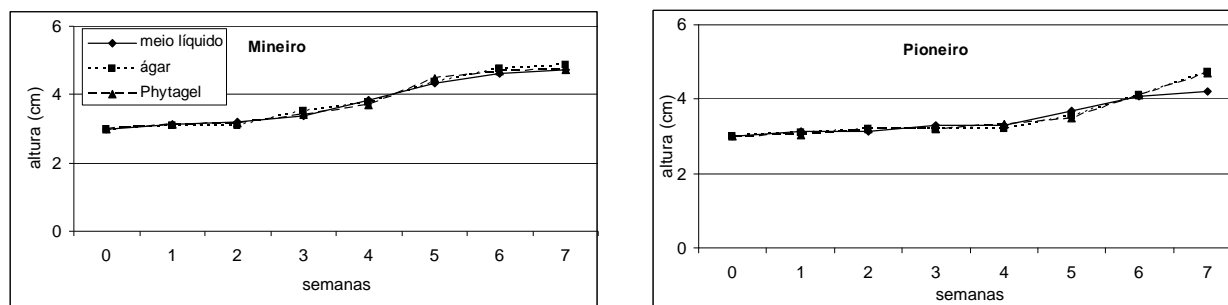
As citocininas pertencem ao grupo de fitorreguladores que atuam na quebra da dominância apical, inibindo o crescimento apical, e estimulando a divisão celular promovendo a proliferação de brotações laterais, o que justifica o pequeno crescimento em altura dos explantes.

Os propágulos obtidos no final desse processo apresentaram excelente qualidade fitossanitária e vigor, com 100% de pegamento ao serem transferidos para a aclimatização, não sendo detectado variação entre os tratamentos.

**TABELA 2** – Número de raízes dos explantes das cvs. Mineiro e Pioneiro em função da consistência do meio de cultura. Lavras, UFLA, 2005.

Consistência do meio de cultura	Número de Raízes/Explante	
	Cv. Mineiro	Cv. Pioneiro
Líquido	2,39 Ba	3,13 Ba
Ágar	3,73 Ba	3,46 Ba
Phytigel®	9,40 Aa	9,46 Aa
CV (%)	37,80	

Médias seguidas por letras diferentes, maiúscula na coluna, (Teste de Scott-Knott, 5%) e minúscula na linha, (Teste de F, 5%) diferem entre si.



**FIGURA 3** – Evolução da altura dos explante de capim-elefante cvs. Mineiro e Pioneiro, durante os 49 dias, em função da consistência do meio de cultura. Lavras, UFLA, 2005.

**TABELA 3** – Altura do explante principal (cm) das cvs. Mineiro e Pioneiro em função da consistência do meio de cultura. Lavras, UFLA, 2005.

Consistência do meio de cultura	Altura do Explante Principal	
	Cv. Mineiro	Cv. Pioneiro
Líquido	4,72 Aa	4,73 Aa
Ágar	4,95 Aa	4,22 Aa
Phytigel	4,72 Aa	4,68 Aa
CV (%)	14,86	

Médias seguidas por letras diferentes, maiúscula na coluna, (Teste de Scott-Knott, 5%) e minúscula na linha, (Teste de F, 5%) diferem entre si.

### CONCLUSÕES

Maior número de brotações, nas cultivares Mineiro e Pioneiro de capim-elefante são obtidas nos meios de cultura suplementados com ágar e Phytigel®.

Para maior produção de raízes, recomenda-se o uso de Phytigel® no meio de cultura.

Para se obter maior proliferação de brotos e boa produção de raízes, nas cultivares Mineiro e Pioneiro, recomenda-se utilizar meio de cultura preparado com Phytigel®.

O crescimento em altura não é afetado pela consistência do meio de cultura.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHAGYALAKSHMI, G.; SINGH, N. S. Meristem culture and micropropagation of a variety of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) with a high yield oleoresin. **Journal of Horticultural Science**, London, n. 63, p. 321-327, 1988.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos**. Brasília, DF: ABCTP/ EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 37-70.

COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação in vitro de sucupira branca (*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.)**. 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

CONSTABEL, F.; SHYLUK, J. P. Initiation, nutrition, and maintenance of plant cell and tissue culture. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 3-15.

FERREIRA, D. F. **Programa de análise estatística SISVAR**. [S.l.: s.n.], 2000.

FINCH, R. P.; BASET, A.; SLAMET, I. H.; COCKING, E. C. *In vitro* shoot culture of wild oryzae and other grass species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 30, n. 1, p. 31-39, 1992.

GEORGE, F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. London: Exegetics, 1993. 574 p.

HAMMERSCHLAG, F. Factors affecting establishment and growth of peach shoots in vitro. **Horticultural Science**, London, n. 17, p. 85-86, 1988.

KARASAWA, M. M. G. **Revigoroamento de cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) submetidas a termoterapia e cultura de tecidos**. 2001. 130 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

KARASAWA, M. M. G.; PINTO, J. E. B. P.; PINTO, J. C.; PEREIRA, A. V. Proliferação de capim-elefante em diferentes concentrações de reguladores de crescimento e consistências de meio de cultura. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1243-1251, nov./dez. 2002.

- KARTHA, K. K. Production and indexing of disease free plants. In: WHITHERS, L. A.; ANDERSON, P. G. **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterworths, 1986. p. 219-238.
- KYTE, L.; KLEYN, J. **Plants from test tubes**: an introduction to micropropagation. 3. ed. Hong Kong: Timber, 1996. 240 p.
- LEE, N.; WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. The effect of agar vs. liquid medium on rooting in tissue-cultured sweetgum. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 2, p. 317-318, Feb. 1986.
- LLOYD, G. B.; McCOWN, B. H. Commercially feasible micropropagation of mountain (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. **Proceedings of the international Plant Propagators Society**, Boulder, v. 30, p. 421-437, 1980.
- MELLOR, F. C.; STACE-SMITH, R. Development of excised potato buds in nutrient medium. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, n. 47, p. 1617-1621, 1969.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassay with *tabacco* tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.
- NEHRA, N. S.; KARTHA, K. K. Meristem and shoot tip culture: requirements and applications. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 37-70.
- PETERSEN, R. G. **Agricultural fields experiments**: design and analysis. New York: M. Dekker, 1994. 409 p.
- THORPE, T. A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p. 17-36.
- ZANETTE, F.; PAILO, W. N.; MORAES, A. Obtenção de mudas de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. var. napier) por cultura de meristemas. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba, v. 10, n. 1/2, p. 175-177, 1988.



# EFEITO DO MEIO DE CULTURA E CONCENTRAÇÕES DE AUXINAS NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE *Prunus cerasifera* CV. MR. S. 1/8

## EFFECT OF CULTURE MEDIA AND CONCENTRATIONS OF AUXINES IN SHOOTING *IN VITRO* OF *Prunus cerasifera* L. CV. MR. S. 1/8

ANDERSON DA COSTA CHAVES<sup>1</sup>, MÁRCIA WULFF SCHUCH<sup>2</sup>, ALAN CRISTIANO ERIG<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Engenheiro Agrônomo, Aluno do PPGA, Área de Concentração em Fruticultura de Clima Temperado – FAEM/UFPel – Campus Universitário – Caixa Postal 354 – 96.010-900 – Pelotas, RS – chaves.ac@bol.com.br

<sup>2</sup>Engenheira Agrônoma, Dra., Professora Adjunta do Departamento de Fitotecnia – FAEM/UFPel – Campus Universitário – Caixa Postal 354 – 96.010-900 – Pelotas, RS.

### RESUMO

Objetivou-se com este trabalho, determinar o melhor meio de cultura, tipo e concentração de auxina no enraizamento *in vitro* de *Prunus cerasifera* L. cv. Mr. S. 1/8. O porta-enxerto Mr. S. 1/8 foi testado em dois meios de cultura MS e WPM, combinado com 0,0; 0,3; 0,6 e 0,9 mg.L<sup>-1</sup> de AIB ou ANA, totalizando 16 tratamentos. Aos 35 dias de cultivo, foram avaliados a porcentagem de enraizamento, o número e comprimento de raízes principais e o número de raízes secundárias. Observou-se que das auxinas testadas, a maior porcentagem de enraizamento foi proporcionada pelo AIB (97,65%), o maior número de raízes primárias estimado (5,48) foi verificado na concentração de 0,64 mg.L<sup>-1</sup> de AIB e o maior comprimento (5,44 cm) na concentração de 0,76 mg.L<sup>-1</sup> de AIB. Observou-se no meio de cultura MS o maior número de raízes secundárias (2,65) por brotação.

**Palavras chave:** *Prunus*, micropropagação, regulador de crescimento, porta-enxerto.

### ABSTRACT

The objective of this work was to establish the best culture medium, and concentration of auxin for *in vitro* rooting of *Prunus cerasifera* L. cv. Mr. S. 1/8. The rootstock Mr. S. 1/8 was tested in the culture media MS and WPM, combined with 0,0; 0,3; 0,6 and 0,9 mg L<sup>-1</sup> IBA or NAA, totalizing 16 treatments. After 35 days of culture, rooting percentage, number and length of main root and number of secondary roots were evaluated. The results showed that off the auxin tested the highest rooting percentage was obtained with IBA (97,65%), the highest number of main root (5,48) was observed at the concentration of 0.64 mgL<sup>-1</sup> IBA and the highest length (5,44 cm) at the concentration of 0.76 mg L<sup>-1</sup> IBA. The highest number (2.65) of secondary root pershoot was observed using the MS culture media.

**Index terms:** Micropropagation, growth regulator, rootstock, *Prunus*.

### INTRODUÇÃO

Na Região Sul do país, as cultivares mais utilizadas como porta-enxerto para fruteiras de caroço são Aldrighi e Capdebosc, devido à facilidade de obtenção de sementes, à facilidade de germinação e à boa compatibilidade com a maioria das cultivares de pessegueiro, nectarina e ameixeira (CHALFUN & HOFFMANN, 1997). No momento, ambas são classificadas como hipersensíveis ao fitonematóide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) (MAUCH, 1991). Em vista disso, muitos estudos estão sendo realizados com o objetivo de adaptar novas cultivares de porta-enxerto para frutas de caroço, buscando características de interesse como resistência a doenças e pragas, adaptação à condição de estresse hídrico, adaptação às condições de solo e clima (SCZEPANSKI, 2001). Entre os porta-enxertos em fase de estudo, está o híbrido Mr. S. 1/8, o qual foi recentemente trazido da Universidade de Pisa (Itália) por meio de convênio firmado com a Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Pelotas, RS. O porta-enxerto cv. Mr. S. 1/8 é uma alternativa para produtores de frutas de caroço da Região Sul do Brasil, devido às características de rusticidade, resistência a fitonematóides e boa compatibilidade de enxertia.

Pela propagação *in vitro*, é possível obter mudas sadias, livre de vírus e outros patógenos, produzindo, assim, um material de alta qualidade genética e sanitária (RODRIGUES et al., 2003; SILVA et al., 2003). Entretanto, a

(Recebido em 17 de março de 2004 e aprovado em 06 de novembro de 2005)

fase de enraizamento *in vitro* com espécies lenhosas não é uma tarefa fácil, sendo esse problema agravado à medida que se utiliza material menos juvenil, uma vez que diminui a capacidade de formar raízes adventícias ao aproximar-se da fase adulta de sua vida (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Nessa fase, as variáveis que mais influenciam são os tipos e concentrações de auxina, e quase todos os trabalhos envolvendo a indução do enraizamento requerem o emprego de auxinas exógenas, tais como: AIB (ácido indolbutírico) ou ANA (ácido naftaleno acético) (MURASHIGE, 1974; WILLIAMS et al., 1985). De acordo com Assis & Teixeira (1998), para todas as auxinas há uma concentração ótima, que pode variar tanto entre as espécies quanto em populações ou clones. O mesmo é relatado por Antonelli & Chiariotti (1988), os quais observaram que no enraizamento de *Prunus* existe uma forte resposta do genótipo ao meio, devido às diferentes exigências nos níveis hormonais.

Considerando a importância de obter novas opções de porta-enxertos para os produtores de frutas de caroço, objetivou-se com este trabalho estabelecer um protocolo para o enraizamento *in vitro* de *Prunus cerasifera* L. cultivar Mr. S. 1/8, a qual foi testada em diferentes meios de cultura, tipo e concentração de auxinas.

#### MATERIAL E MÉTODOS

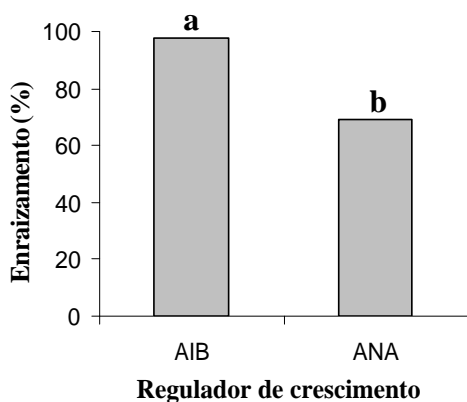
O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, RS. Foi avaliada a cultivar de *Prunus cerasifera* L. cv. Mr. S. 1.8 nos meios de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), e WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), e as concentrações de: 0,0; 0,3; 0,6 e 0,9 mg.L<sup>-1</sup> de AIB ou ANA. Foram utilizadas brotações estabelecidas com 1,5 cm de comprimento e com 35 dias de cultivo em meio MS. Utilizaram-se frascos com capacidade de 250 ml com 30 ml de meio de cultura, com pH ajustado para 5,8 e geleificado com ágar na concentração de 6 g.L<sup>-1</sup>, posteriormente, autoclavado a 121 °C e 1,5 atm por 15 minutos. O material

inoculado foi cultivado em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, luminosidade de 25 µmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e temperatura de 25 ± 1 °C. O delimitamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições por tratamento. As parcelas foram constituídas de 5 frascos com 4 explantes. Utilizando-se um desenho fatorial 2x4x2, sendo os fatores meio (MS e WPM), concentrações (0,0; 0,3; 0,6 e 0,9 mg.L<sup>-1</sup>) e tipo de auxina (AIB ou ANA).

Após 35 dias de cultivo, avaliaram-se a porcentagem de enraizamento (transformado segundo arc. sen. de raiz quadrada de x/k), o número de raízes principais e secundárias, transformadas segundo raiz quadrada de x+1 e raiz quadrada de x+0,5, respectivamente) e o comprimento de raízes (mm). A análise da estatística dos dados foi realizada pela análise da variação e decomposição para os fatores, meio e tipo de auxina, pela comparação de médias por meio do teste de Duncan (α = 0,05), e concentração de auxina, pela análise de regressão polinomial. O nível mínimo de significância adotado em todos os testes foi de 5%. As análises estatísticas foram executadas pelo programa SANEST - Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (ZONTA & MACHADO, 1984).

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a variável porcentagem de enraizamento, houve diferença apenas para o tipo de auxina. A maior porcentagem de enraizamento aos 35 dias de cultivo foi observada com as brotações cultivadas no meio de cultura com AIB (97,65%), quando comparado com as cultivadas no meio de cultura com ANA, que apresentaram 68,85% de enraizamento (Figura 1). Almehdi & Parfitt (1986), utilizando AIB para o enraizamento dos porta-enxertos de pessegueiro 'Lovell' e Nemaguard, obtiveram 70% de enraizamento. Já Miller et al. (1982) observaram 83% de enraizamento do porta-enxerto de *Prunus* Nemaguard, em meio acrescido de ANA. Com esses resultados, verifica-se que no enraizamento *in vitro* de *Prunus* há possibilidade de se obter diferentes respostas devido às exigências hormonais particulares de cada genótipo.



**FIGURA 1** – Porcentagem de enraizamento para a cultivar de *Prunus cerasifera* cv. Mr. S. 1/8, aos 35 dias de cultivo utilizando dois reguladores de crescimento. Médias seguidas por letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5%. FAEM/UFPEL-RS. 2003.

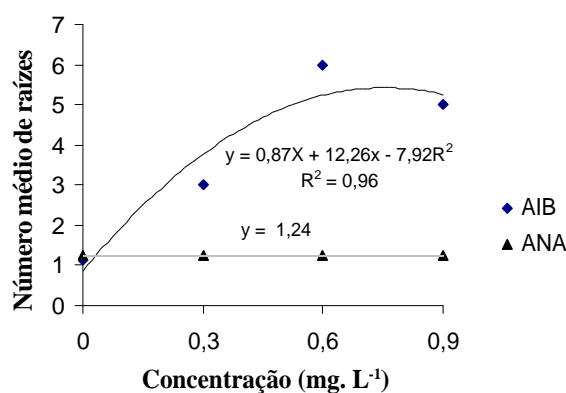
Quanto ao número médio de raízes, observou-se diferença significativa para a concentração de auxina. O comportamento da variável “número de raízes” foi quadrático para a auxina AIB, nas concentrações utilizadas, atingindo o valor máximo de estimado de 5,48 raízes por brotação em respostas à concentração de 0,64 mg.L<sup>-1</sup> de AIB. Já para o ANA, as concentrações não influenciaram significativamente o número de raízes, atingindo o número médio de 1,24 raiz por brotação (Figura 2). Os resultados obtidos com AIB neste experimento são superiores aos obtidos por Sczepanski (2001) no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de ameixeira Mirabolano (*Prunus cerasifera*), obtendo a maior quantidade de raízes (1,64) na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB.

Neste trabalho, foram encontrados valores superiores aos obtidos por Marino (1986) que, durante o enraizamento *in vitro* do híbrido de *Prunus pérsica* x *Prunus kansuensis* S 749 x S1490, observou um número médio de 2,2 raízes por explante na concentração de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de AIB. Esses resultados estão de acordo com Zimmerman (1988), que cita que as cultivares apresentam comportamentos diferentes dentro de uma mesma espécie, podendo ocorrer respostas distintas para uma mesma variável estudada.

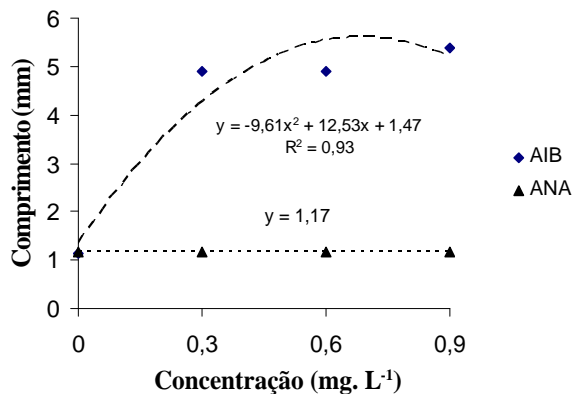
Quanto à variável “comprimento de raízes”, houve diferença apenas para o fator concentração de auxina. A cultivar apresentou um comportamento quadrático nas concentrações de AIB, atingindo o ponto de máximo (5,44 cm) na concentração de 0,76 mg.L<sup>-1</sup>; já quando foi utilizada a auxina ANA no meio de cultura, as concentrações desse regulador não influenciaram o comprimento das raízes (Figura 3).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a utilização de diferentes tipos e concentrações de auxinas influenciam em grande parte a fase de enraizamento *in vitro*. Entretanto, altas concentrações poderão promover a formação de calos, prejudicando as taxas de enraizamento e, conseqüentemente, o comprimento das raízes, o que se pode verificar na curva de regressão para a auxina AIB (Figura 3).

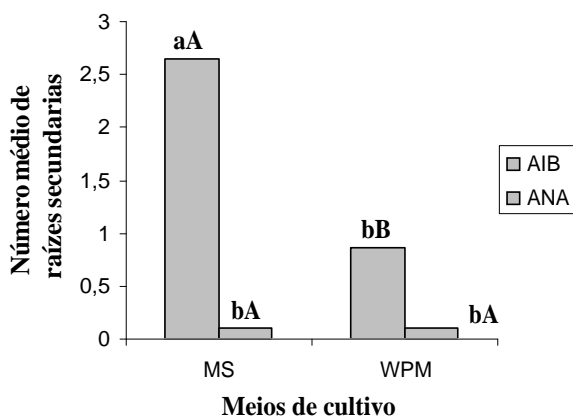
Para a variável “número de raízes secundárias”, foi observada interação entre os fatores meio de cultura e tipo de auxina. Para o AIB, o meio de cultura MS apresentou média de 2,65 raízes secundárias por brotação, significativamente superior ao meio WPM, no qual foi observada média de 0,86 raiz por brotação. Entretanto, quando foi adicionado ANA nos dois meios de cultura em estudo, as médias foram muito baixas, não diferindo entre os dois meios em estudo (Figura 4).



**FIGURA 2** – Número de raízes por brotação para a cultivar de *Prunus cerasifera* cv. Mr. S. 1/8 em função das concentrações dos reguladores de crescimento AIB e ANA, aos 35 dias de cultivo *in vitro*. FAEM/UFPEL-RS. 2003.



**FIGURA 3** – Comprimento de raízes para a cultivar de *Prunus cerasifera* cv. Mr. S. 1/8 em função das concentrações dos reguladores de crescimento AIB e ANA, aos 35 dias de cultivo *in vitro*. FAEM/UFPEL-RS. 2003.



**FIGURA 4** – Número de raízes secundárias para a cultivar de *Prunus cerasifera* cv. Mr. S. 1/8, aos 35 dias de cultivo em dois meios de cultura, utilizando dois reguladores de crescimento. Médias seguidas por letras distintas, minúscula dentro de meio de cultura e maiúscula entre regulador de crescimento diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5%. FAEM/UFPEL-RS. 2003.

### CONCLUSÕES

Nas condições em que o experimento foi realizado, pode-se concluir que:

1. Das auxinas testadas, o AIB é mais efetivo no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto cv. Mr. S. 1/8.

2. Concentrações de AIB superiores a 0,64 mg.L<sup>-1</sup> inibem o aumento do número de raízes formadas por brotação.

3. O maior comprimento médio da raiz é obtido com 0,76 mg.L<sup>-1</sup> de AIB.

4. O meio de cultura MS induz maior número de raízes secundárias (2,65) em brotações do porta-enxerto cv. Mr. S. 1/8.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEHDI, A. A.; PARFITT, D. E. *In vitro* propagation of peach: I. propagation of 'Lovell' and 'Nemaguard' peach rootstocks. **Fruit Varieties Journal**, Massachusetts, v. 40, n. 1, p. 12-17, 1986.

ANTONELLI, M.; CHIARIOTTI, A. *In vitro* rooting of different peach genotypes. **Acta Horticulturae**, Pisa, v. 227, p. 414-417, 1988.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-CNPq, 1998. p. 183-260.

CHALFUN, N. N. J.; HOFFMANN, A. Propagação do pessegueiro e da ameixeira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 189, p. 23-29, 1997.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Alexandria, v. 30, p. 421-427, 1980.

MARINO, G. Effecto del placobutazolo sulla radicazione *in vitro* di un portainnesto ibrido di *Prunus* spp. **Revista di Ortofrutticoltura Italiana**, Firenze, v. 70, p. 267-275, 1986.

MAUCH, C. H. **Comportamento de pessegueiro [*Prunus pérsica* (L.) Batsch.] e de ameixeira [*Prunus cerasifera* (Ehre)] em relação a *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White 1919)**. 1991. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fitossanidade) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1991.

- MILLER, G. A.; COSTON, D. C.; DENNY, E. G.; ROMEO, M. E. *In vitro* propagation of Nemaguard peach rootstock. **HortiScience**, Alexandria, v. 17, n. 2, p. 194, 1982.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, California, v. 25, p. 135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- RODRIGUES, A. C.; SILVEIRA, C. A. P.; FORTES, G. R. de L.; FACHINELLO, J. C.; SILVA, J. B. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Prunus* sp. em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 131-133, 2003.
- SCZEPANSKI, P. H. G. **Propagação *in vitro* do porta-enxerto de ameixeira Mirabolano (*Prunus ceracifera Ehrh*)**. 2001. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fruticultura de Clima Temperado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2001.
- SILVA, A. L. da; ROGALSKI, M.; MORAES, L. K. A.; FESLIBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 297-300, 2003.
- ZIMMERMAN, R. H. Cultivo de tecidos. In: MOORE, J. N.; JANICK, J. **Métodos genotécnicos en frutales**. Mexico: AGT, 1988. p. 167-182.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: DMEC/IFM/UFPel, 1984. 138 p.
- WILLIAMS, R. R.; TAJI, A. M.; BOLTON, J. Specificity and interaction among auxins, light and pH in rooting of Australian woody species *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 20, n. 6, p. 1052-1053, 1985.

# EFEITO DO TIPO DE INCISÃO SOBRE A DOMINÂNCIA APICAL EM ÁPICES CAULINARES EM DUAS CULTIVARES DE BANANEIRA (*Musa sp.*)

## EFFECT OF SHOOT TIP CUTTINGS ON APICAL DOMINANCE OF TWO BANANA (*Musa sp.*) CULTIVARS

ANA CRISTINA PORTUGAL PINTO DE CARVALHO<sup>1</sup>, ALEXANDRA MARIA GOMES COSTA<sup>2</sup>, MAURÍCIO REGINALDO ALVES DOS SANTOS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Doutora em Ciências Biológicas/Genética – Embrapa Agroindústria Tropical – Caixa Postal 3761 – 60.511-110 – Fortaleza, CE – cristina@cnpat.embrapa.br

<sup>2</sup>Mestre em Agronomia/Fitotecnia – Embrapa Agroindústria Tropical – Caixa Postal 3761 – 60.511-110 – Fortaleza, CE – alexmgc@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Doutor em Agronomia/Fitotecnia – Embrapa Rondônia, Caixa Postal 406 – 78.900-970 – Porto Velho, RO – mauricioreginaldo@yahoo.com.br

### RESUMO

Avaliaram-se três tipos de incisão em ápices caulinares de bananeira (*Musa sp.*) *in vitro*, nas cultivares Pacovan e Maçã, sobre a dominância apical, no processo de estabelecimento da cultura: ápice inteiro (T1), incisão longitudinal, sem seccionamento (T2) e incisão longitudinal, com seccionamento do ápice em duas metades (T3). Após dez dias em meio MS suplementado com BAP (11,1  $\mu$ M), observou-se o número de gemas axilares obtidas a partir de cada explante. Os valores obtidos, para a cultivar Pacovan, em T1 (3,80) e T2 (3,70) foram equivalentes entre si e superiores ao obtido em T3 (2,85). Para Maçã, os valores registrados em T1 (4,08) e T2 (4,38) também foram equivalentes entre si, mas inferiores ao obtido em T3 (6,21). Recomenda-se a utilização de ápices caulinares inteiros e o seu seccionamento em duas metades, para as cultivares Pacovan e Maçã, respectivamente, visando a maximizar a obtenção de gemas axilares, aumentando a taxa de multiplicação *in vitro*.

**Termos para indexação:** Micropropagação, fruticultura, produção de mudas, *Musa*.

### ABSTRACT

The effect of three shoot tip cuttings on apical dominance of banana (*Musa sp.*), cultivars Pacovan and Maçã was studied during the process of the *in vitro* establishment: whole shoot tip (T1), longitudinal cutting, without separating in two parts (T2) and longitudinal cutting, forming two halves (T3). The number of axillary buds from each explant was evaluated, after 10 days in MS medium supplemented with 11,1  $\mu$ M BA. For Pacovan cultivar, T1 (3.80) and T2 (3.70) values were equivalent and higher than T3 (2.85). For Maçã cultivar, T1 (4.08) and T2 (4.38) values were also equivalent, but superior than T3 (6.21). The results showed that use of whole shoot tip and to have it cut into two halves, is adequate for the micropropagation of Pacovan and Maçã cultivars, respectively.

**Index terms:** Micropropagation, fructiculture, seedling production, *Musa*.

### INTRODUÇÃO

Com o aumento do consumo mundial de banana, a abertura de novos mercados e a maior exigência dos consumidores brasileiros, evidencia-se a necessidade de novas estratégias de cultivo, de novas áreas de plantio e renovação de áreas pouco produtivas, sendo fundamental a utilização de mudas de bananeira com alta qualidade genética e fitossanitária (TRINDADE et al., 2003).

Tradicionalmente, a bananeira (*Musa spp.*) é propagada vegetativamente a partir de brotações laterais, cujas taxas de multiplicação são baixas, além de permitir a disseminação de doenças e pragas (ALLOUFA et al., 2002). A multiplicação *in vitro* consiste na melhor alternativa para se obter quantidade suficiente de mudas dessa espécie para o estabelecimento de novos plantios, principalmente de cultivares/híbridos recém-lançados (OLIVEIRA et al., 2001). As mudas podem ser multiplicadas em qualquer época do ano, em pequeno espaço físico, livres de pragas e doenças, proporcionando homogeneidade nos tratamentos culturais e colheita, com florescimento antecipado em até quatro meses (ZERDA, 1991), e propicia colheitas superiores às das plantas oriundas da propagação convencional (DREW & SMITH, 1990). Além disso, as mudas propagadas pela cultura de tecidos apresentam maior vigor e facilidade no transporte e plantio. Tais

(Recebido em 04 de abril de 2005 e aprovado em 11 de janeiro de 2006)

atributos compensam o custo de produção mais alto das mudas micropropagadas em relação aos propágulos naturais de bananeira (LEMOS et al., 2001).

Em diferentes estudos, verifica-se, que a cultura de ápices caulinares é uma técnica eficiente para micropropagar mudas de bananeira (ALLOUFA et al., 2002), a qual vem sendo adotada em muitos países e, no Brasil, tem sido utilizada de maneira crescente nos últimos anos (ÁLVARES & CALDAS, 2002). Apesar de a técnica de propagação *in vitro* de bananeira ser bastante difundida, há carência de trabalhos relacionados com o aumento da taxa de multiplicação, particularmente em relação à quebra de dominância apical por meio de incisões no estabelecimento da cultura dos ápices caulinares. Esse procedimento não é adotado na maioria dos protocolos de micropropagação de bananeira, nos quais se utilizam ápices caulinares inteiros (BRAGA et al., 2001; LEMOS et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2001; OLIVEIRA & SILVA, 1997; SANTANA & ALLOUFA, 2000).

Objetivou-se neste trabalho, avaliar diferentes tipos de incisão em ápices caulinares de bananeira *in vitro*, cultivares Pacovan e Maçã, sobre a multiplicação de gemas axilares, visando à maximização da produção de mudas a partir desses explantes.

## MATERIAL E MÉTODOS

Rizomas de bananeira, cultivares Pacovan e Maçã foram obtidos de plantas mantidas no campo, em propriedade rural, em Limoeiro do Norte – CE e conduzidos ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal da Embrapa Agroindústria Tropical, onde foram retiradas as bainhas externas e os rizomas reduzidos a estruturas de 1,5 cm<sup>3</sup>, contendo o ápice caulinar. Esses excisados foram lavados em hipoclorito de sódio a 2%, durante dois minutos e, em câmara de fluxo laminar, imersas em álcool 70% por dois minutos, e em hipoclorito de sódio a 5%, durante 15 minutos. Após três imersões em água destilada por dois minutos, foram extraídos ápices caulinares com

aproximadamente 0,71 cm<sup>3</sup> (0,6 x 0,7 x 1,7 mm, largura, comprimento e altura, respectivamente), os quais foram inoculados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de BAP (4,4, µM), carvão ativado (250 mg/L), sacarose (30 g/L), e ágar (4,5 g/L), e mantidos por sete dias em câmara de crescimento a 24 ± 1°C, no escuro. Após 7 dias, foram subcultivados para os seguintes tratamentos: T1 – ápice inteiro; T2 – incisão longitudinal, sem seccionamento; e T3 – incisão longitudinal, com seccionamento do ápice em duas metades. Os explantes submetidos aos tratamentos T1 e T2 foram posicionados no meio de cultura na mesma posição em que são encontrados na muda (verticalmente). Já os explantes resultantes do T3 foram colocados com a parte cortada voltada para o meio de cultura (horizontalmente). Esses explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 5,0 mL do meio MS, acrescido de BAP (11,1 µM), sacarose (30 g/L) e ágar (4,5 g/L) e mantidos a 24 ± 1°C e fotoperíodo de 16 horas. Utilizou-se delineamento em blocos ao acaso, com 20 repetições por tratamento, sendo a unidade experimental um tubo de ensaio contendo um explante. Após dez dias de inoculação, avaliou-se o número de gemas axilares obtidas a partir de cada explante. Essas gemas apresentavam a altura média de 1,0 cm. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para fins de análise estatística, os dados obtidos foram transformados em  $\sqrt{x} + 0,5$ .

É importante ressaltar que as análises estatísticas foram efetuadas separadamente, uma vez que não se tem como objetivo neste trabalho comparar cultivares, e sim determinar o tipo de incisão mais adequado para cada genótipo testado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar que, para cultivar Pacovan, o tratamento com ápices seccionados em duas metades (T3) o número de gemas por explantes foi inferior aos demais

tratamentos, apresentando valor médio de 2,85 (Tabela 1). Verificou-se maior número de gemas axilares por explante, nos tratamentos com ápice inteiro (3,80) e com incisão longitudinal, sem seccionamento do explante (3,70). É possível que, para esse genótipo, o seccionamento dos ápices em dois explantes tenha reduzido excessivamente as reservas necessárias para suprir a demanda de metabólitos para os processos de diferenciação e brotação das gemas axilares. Alloufa et al. (2002) ressaltam que um dos entraves da cultura de ápices caulinares de bananeira é a formação de compostos fenólicos, os quais são liberados pelas células danificadas com o corte e oxidam rapidamente, provocando a necrose dos explantes. Além disso, o corte dos explantes aumenta a superfície de tecidos oxidados, diminuindo a capacidade de absorção de nutrientes e hormônios pelos tecidos (ZAFFARI et al., 1994).

Entretanto, para cultivar Maçã, pode-se observar que o tratamento com ápices seccionados em duas metades (T3) foi superior aos demais tratamentos, apresentando valor médio de 6,21 gemas axilares por ápice caulinar (Tabela 1). O seccionamento do ápice caulinar é considerado o método físico mais adequado na superação da dominância apical em várias culturas, como discutido por George (1993). Em geral, o seccionamento é seguido do posicionamento horizontal dos explantes no meio de

cultivo, para evitar o fluxo de auxinas do ápice para a base nesses explantes (MACKAY & KITTO, 1988). A aplicação de incisões longitudinais em ápices de bananeira, cv. Grande Naine, foi estudada por Zaffari et al. (1994). Esses autores conseguiram superar a dominância apical utilizando três incisões longitudinais no ápice, sem seccioná-lo. Neste trabalho, os autores atribuíram o aumento do número de gemas axilares ao efeito do dano físico ao meristema e/ou tecidos adjacentes ao ele, em adição ao efeito da citocinina presente no meio de cultivo. Em estudo posterior, Zaffari et al. (2000) constataram que a razão auxina/citocinina na porção basal dos ápices caulinares é alta no início da cultura (em torno de 0,5), reduz sensivelmente aos 30 dias de cultivo (menor que 0,1) e é praticamente nula aos 75 dias, em ápices caulinares seccionados longitudinalmente.

De acordo com os resultados obtidos, foram observadas diferenças significativas no número de gemas obtidas dependendo do tipo de incisão aplicada no ápice caulinar, para cada genótipo estudado, indicando a não-recomendação do uso de um protocolo comum para as duas cultivares. Portanto, recomenda-se a utilização de ápices caulinares inteiros e seccionados em duas metades, para as cultivares Pacovan e Maçã, respectivamente, para maximizar a obtenção de gemas axilares, aumentando a taxa de multiplicação *in vitro* de bananeira.

**TABELA 1** – Número médio de gemas axilares por ápice caulinar de bananeira, cultivares Pacovan e Maçã, aos 10 dias de cultivo em meio MS com 11,1  $\mu$ M de BAP, após diferentes tipos de incisão. Fortaleza, 2004.

Tratamentos	Número de gemas por explante	
	Pacovan	Maçã
T1 - Ápice inteiro	3,80 a	4,08 b
T2 - Incisão longitudinal, sem divisão ao meio	3,70 a	4,38 b
T3 - Incisão longitudinal, com divisão do ápice em duas metades	2,85 b	6,21 a

\*Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.



## CONCLUSÕES

1.A utilização de ápices caulinares inteiros permite maior taxa de multiplicação *in vitro*, na cultivar de bananeira Pacovan.

2.O seccionamento do ápice caulinar em duas metades proporciona maior taxa de multiplicação *in vitro*, na cultivar de bananeira Maçã.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e à Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) pela concessão de bolsas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLOUFA, M. A. I.; MACÊDO, C. E. C.; BARROSO, P. A. V.; BARBALHO, A. D.; OLIVEIRA, C. H. B. Avaliação de dois agentes antioxidantes no estabelecimento *in vitro* de inflorescências de bananeira (*Musa spp*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 1092-1096, 2002.
- ÁLVARES, M. C.; CALDAS, L. S. Crescimento, produção e variação somaclonal em bananeiras micropropagadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 415-420, 2002.
- BRAGA, M. F.; SÁ, M. E. L.; MUSTAFÁ, P. C. Avaliação de um protocolo para multiplicação *in vitro* da bananeira (*Musa sp.*) cv. Caipira (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 215-219, 2001.
- DREW, R. A.; SMITH, M. K. Field evaluation of tissue-cultured bananas in South-Eastern Queensland. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 30, n. 4, p. 569-574, 1990.
- GEORGE, E. F. Plant propagation by micropropagation. In: \_\_\_\_\_. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. p. 37-66.
- LEMONS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C. A.; OLIVEIRA, J. G. L. O.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 482-487, 2001.
- MACKAY, W. A.; KITTO, S. L. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation of french tarragon. **HortScience**, Alexandria, v. 111, n. 2, p. 282-287, 1988.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OLIVEIRA, R. P.; SILVA, S. O. Avaliação da micropropagação comercial em bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 415-420, 1997.
- OLIVEIRA, R. P.; SILVEIRA, D. G.; SILVA, S. O. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraplóide (grupo AAAB). **Sientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 73-78, 2001.
- SANTANA, R. A. S.; ALLOUFA, M. A. I. Propagação *in vitro* da bananeira (*Musa sp*) cultivar Pacovan: efeito de várias concentrações de BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 3, p. 481-482, 2000.
- TRINDADE, A. V.; LINS, G. M. L.; MAIA, I. C. S. Substrates and the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* in the growth of micropropagated bananas plants. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 137-142, 2003.
- ZAFFARI, G. R.; KERBAUY, G. B.; KRAUS, J. E.; ROMANO, E. C. Hormonal and histological studies related to *in vitro* banana bud formation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 63, p. 187-192, 2000.
- ZAFFARI, G. R.; SILIMAN FILHO, L. F.; STUKER, H. Efeito do tamanho do explante e da quebra de dominância apical, sobre a brotação das gemas laterais na produção de mudas de bananeira, *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 16, n. 3, p. 71-76, 1994.
- ZERDA, A. A. Successes and prospects in biotechnology in Colômbia: the case of bananas and flowers. **Revista Nacional de Agricultura**, Bogotá, n. 897, p. 89-94, 1991.



## NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS E COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

1. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos e comunicações serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

2. A revista “**Plant Cell Culture & Micropropagation**”, editada semestralmente pela Editora da Universidade Federal de Lavras (Editora UFLA), publica artigos científicos e comunicações científicas da área de cultura de tecidos de plantas, elaborados por membros da comunidade científica nacional e internacional. Não é cobrada taxa para publicação de trabalhos. É condição fundamental que os artigos/comunicações submetidos à apreciação da revista “**Plant Cell Culture & Micropropagation**” não foram e nem serão publicados simultaneamente em outro lugar. Com a aceitação do artigo para publicação, os editores adquirem amplos e exclusivos direitos sobre o artigo para todas as línguas e países. A publicação de artigos/comunicações dependerá da observância das Normas Editoriais, dos pareceres do Corpo Editorial e da Comissão *ad hoc*. Todos os pareceres têm caráter sigiloso e imparcial, e tanto os autores quanto os membros do Corpo Editorial e/ou Comissão *ad hoc* não obtêm informações identificadoras entre si.

3. Os artigos e comunicações submetidos para publicação deverão ser apresentados em meio magnético (disquete 3½”) ou CDR, utilizando-se o processador de texto **Microsoft Word for Windows** (version 98, 2000, XP ou 2003), ser escrito em língua portuguesa, inglesa ou espanhola e usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas, não empregando abreviaturas no título do artigo. Juntamente com o disquete (ou CDR), deverão ser enviadas **4 (QUATRO)** vias, sendo uma original e as demais cópias omitindo os autores e a chamada de rodapé da primeira página (para serem enviadas aos consultores científicos), impressas em papel branco, tipo A4 (21cm x 29,7cm), ou em formulário contínuo em uma só face, espaço duplo entre linhas, fonte: Times New Roman, tamanho: 12, observada uma margem de 3 cm para o lado esquerdo e de 2 cm para o direito, 2,5 cm para margem superior e inferior, 2,5 cm para o cabeçalho e 2,5 cm para o rodapé. Cada trabalho deverá ter no **máximo 14 páginas** e junto do mesmo deverá ser encaminhado ofício dirigido ao Editor Chefe da revista, solicitando a publicação do artigo. Esse ofício deverá ser **assinado por todos os autores**, constar o endereço completo, telefone e e-mail de todos. Qualquer inclusão, exclusão ou alteração na ordem dos autores, deverá ser notificada mediante ofício assinado por todos os autores (inclusive do autor excluído).

4. O **artigo científico** deverá conter os seguintes tópicos: a) **TÍTULO**, suficientemente claro, conciso e completo, evitando palavras supérfluas. Recomenda-se começar pelo termo que

represente o aspecto mais importante do trabalho, com os demais termos em ordem decrescente de importância. b) **TÍTULO EM INGLÊS**; c) **NOME(s) DO(s) AUTOR(es)** no máximo 6 (seis), em letras maiúsculas, um após o outro, centralizados, e no rodapé da primeira página, deverão vir a formação acadêmica e a Instituição onde trabalham; d) **RESUMO** (de acordo com NBR6028 da ABNT). O resumo não deve ultrapassar a 250 (duzentos e cinquenta) palavras e não possuir parágrafos. Após o Resumo devem-se incluir **TERMOS PARA INDEXAÇÃO** (palavras-chave), diferentes daqueles constantes do título e separados por vírgula. Os termos para indexação devem estar descritos na forma maiúscula e minúscula, serem expressões que identifiquem o conteúdo do artigo, ser indicadas entre 3 e 5, e se possível, extraídas do vocabulário Thesagro – Thesaurus Agrícola Nacional, desenvolvido pela CENAGRI (indicação da revista “**Plant Cell Culture & Micropropagation**” para evitar o uso de vários sinônimos como termos de indexação). Se não forem encontrados descritores disponíveis para cobrirem a temática do artigo, poderão ser indicados termos ou expressões de uso conhecido; e) **ABSTRACT**, incluindo, em seguida, **INDEX TERMS**; f) **INTRODUÇÃO** (incluindo a revisão de literatura); g) **MATERIAL E MÉTODOS**; h) **RESULTADOS E DISCUSSÃO** (podendo conter tabelas e figuras); i) **CONCLUSÕES**; e j) **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**.

5. A **comunicação** deverá conter os seguintes tópicos: a) **TÍTULO**, suficientemente claro, conciso e completo, evitando palavras supérfluas. Recomenda-se começar pelo termo que represente o aspecto mais importante do trabalho, com os demais termos em ordem decrescente de importância. Deve ser apresentada a versão do título para o idioma inglês; b) **TÍTULO EM INGLÊS**; c) **NOME(s) DO(s) AUTOR(es)** no máximo 6 (seis), em letras maiúsculas, um após o outro, centralizados, e no rodapé da primeira página, deverão vir a formação acadêmica e a Instituição onde trabalham; d) **RESUMO** (de acordo com NBR6028 da ABNT). O resumo não deve ultrapassar a 250 (duzentos e cinquenta) palavras e não possuir parágrafos. Após o Resumo devem-se incluir **TERMOS PARA INDEXAÇÃO** (palavras-chave), diferentes daqueles constantes do título e separados por vírgula. Os termos para indexação devem estar descritos na forma maiúscula e minúscula, serem expressões que identifiquem o conteúdo do artigo, ser indicadas entre 3 e 5; e) **ABSTRACT**, incluindo, em seguida, **INDEX TERMS**; f) **TEXTO** [sem subdivisão, porém com introdução, material e métodos, resultados e discussão e conclusão subtendidos (podendo conter tabelas ou figuras)] e g) **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**.

6. **AGRADECIMENTOS:** ao fim do texto e, antes das Referências Bibliográficas, poderão vir os agradecimentos a pessoas ou instituições. O estilo, também aqui, deve ser sóbrio e claro, indicando as razões pelas quais se fazem os agradecimentos.

7. **TABELAS E QUADROS:** deverão ser inseridos após citação dos mesmos dentro do próprio texto.

8. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:** as referências bibliográficas devem ser citadas conforme a NBR6023/2002 da ABNT.

**A exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto são de responsabilidade do(s) autor(es) do artigo.**

#### **Orientações gerais:**

- Deve-se apresentar todos os autores do documento científico (fonte);
- O nome do periódico deve ser descrito por extenso, não deve ser abreviado;
- Em todas as referências deve-se apresentar o local de publicação (cidade), a ser descrito no lugar adequado para cada tipo de documento;
- As referências devem ser ordenadas alfabeticamente.

#### **EXEMPLIFICAÇÃO (TIPOS MAIS COMUNS):**

##### ARTIGO DE PERIÓDICO:

VIEIRA, R. F.; RESENDE, M. A. V. de. Épocas de plantio de ervilha em Patos de Minas, Uberaba e Janaúba, Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 74-80, jan./mar. 2000.

##### LIVRO:

a) Livro no todo:

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. New York: McGraw-Hill Book, 1960. 481 p.

b) Parte de livro com autoria específica:

FLEURY, J. A. Análise ao nível de empresa dos impactos da automação sobre a organização da produção de trabalho. In: SOARES, R. M. S. M. **Gestão da empresa**. Brasília: IPEA/IPLAN, 1980. p. 149-159.

c) Parte de livro sem autoria específica:

MARTIM, L. C. T. Nutrição de bovino de corte em confinamento. In: \_\_\_\_\_. **Confinamento de bovino de corte**. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1986. cap. 3, p. 29-89.

##### DISSERTAÇÃO E TESE:

GONÇALVES, R. A. **Preservação da qualidade tecnológica de trigo (*Triticum aestivum* L.) e controle de *Rhizopertha dominica* (F.) durante o armazenamento em atmosfera controlada com Co<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>**. 1997. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

MATIOLI, G. P. **Influência do leite proveniente de vacas mastíticas no rendimento de queijo frescal**. 2000. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

Nota: “A folha é composta de duas páginas: anverso e verso. Alguns trabalhos, como teses e dissertações são impressos apenas no anverso e, neste caso, indica-se f.” (ABNT, NBR6023/2002, p. 18).

##### TRABALHOS DE CONGRESSO E OUTROS EVENTOS:

SILVA, J. N. M. Possibilidades de produção sustentada de madeira em floresta densa de terra firme da Amazônia brasileira. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. **Anais...** Campos do Jordão: SBS/SBEF, 1990. p. 39-45.

##### DOCUMENTOS ELETRÔNICOS:

As obras consultadas *online* são referenciadas conforme normas específicas para cada tipo de documento (monografia no todo e em parte, trabalho apresentado em evento, artigo de periódico, artigo de jornal, etc.), **acrescidas de informações sobre o endereço eletrônico apresentado entre braquetes (< >), precedido da expressão “Disponível em:” e da data de acesso ao documento, precedida da expressão “Acesso em:”**.

Nota: “Não se recomenda referenciar material eletrônico de curta duração nas redes” (ABNT, NBR6023/2000, p. 4). Segundo padrões internacionais, a divisão de endereço eletrônico, no fim da linha, deve ocorrer sempre após barra (/).

##### Monografia (acesso online):

a) Livro no todo

TAKAHASHI, T. (Coord.). **Tecnologia em foco**. Brasília: Socinfo/MCT, 2000. 90 p. Disponível em: <<http://www.socinfo.org.br>>. Acesso em: 22 ago. 2000.

b) Parte de livro

TAKAHASHI, T. Mercado, trabalho e oportunidades. In: \_\_\_\_\_. **Sociedade da informação no Brasil**: livro verde. Brasília: Socinfo/MCT, 2000. cap. 2, p. 13-24. Disponível em: <<http://www.socinfo.gov.br>>. Acesso em: 22 ago. 2000.

c) Parte de congresso, seminário, etc.

GIESBRECHT, H. O. Avaliação de desempenho de institutos de pesquisa tecnológica: a experiência de projeto excelência na pesquisa tecnológica. In: CONGRESSO ABIPTI, 2000, Fortaleza. **Gestão de institutos de pesquisa tecnológica**. Fortaleza: Nutec, 2000. Disponível em: <<http://www.abipti.org.br>>. Acesso em: 01 dez. 2000.

d) Tese

SILVA, E. M. **Arbitrariedade do signo**: a língua brasileira de sinais (LIBRAS). 1997. 144 p. Dissertação (Mestrado em Lingüística Aplicada e Estudo de Língua) - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 1997. Disponível em: <<http://www.terra.com.br/virtualbooks/freebook/port/did/teses.htm>>. Acesso em: 28 nov. 2000.

Artigo de periódico (acesso online):

RESENDE, A. M. G. Hipertexto: tramas e trilhas de um conceito contemporâneo. **Informação e Sociedade**, Recife, v. 10, n. 1, 2000. Seção Educação. Disponível em: <<http://www.informacoesociedade.ufpb.br/>>. Acesso em: 30 nov. 2000.

CITAÇÃO: PELO SISTEMA ALFABÉTICO (AUTOR-DATA)  
(conforme ABNT, NBR10520/2002)

Dois autores - Steel & Torrie (1960) ou (STEEL & TORRIE, 1960).

Três ou mais autores - Valle et al. (1945) ou (VALLE et al., 1945).

Obs.: Quando forem citados dois autores de uma mesma obra deve-se separá-los pelo sinal & (comercial).

## 9. CASO O ARTIGO CONTENHA FOTOGRAFIAS, GRÁFICOS, FIGURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS, ESSAS DEVERÃO OBEDECER ÀS SEGUINTE NORMAS:

9.1 **Gráficos, Figuras e/ou Fotografias** deverão ser apresentadas em **preto e branco**, nítidas e com contraste, escaneadas, inseridas no texto após a citação das mesmas e também em um arquivo à parte, **salvas em extensão “tiff” com resolução de 300 dpi**;

9.2 **Símbolos e Fórmulas Químicas** deverão ser feitas em processador que possibilite a formatação para o programa **Page Maker**, sem perda de suas formas originais.

10. O Editor Chefe notificará o autor do recebimento do original e, posteriormente, o informará sobre sua publicação. Os artigos que necessitarem de modificações serão devolvidos ao autor para a devida revisão.

11. Os artigos não aprovados serão devolvidos.

12. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

13. O não-cumprimento dessas normas implicará na devolução do artigo ao autor.

14. Os casos omissos serão resolvidos pela Comissão Editorial

15. O artigo deverá ser enviado para:

**ABCTP**

**Plant Cell Culture & Micropropagation**

**Universidade Federal de Lavras**

**Depto. de Biologia - Setor de Fisiologia Vegetal**

**Caixa Postal: 3037**

**Lavras – MG**

**CEP 37200-000**

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

1. Concepts and affirmations included in articles and communications are of the entire responsibility of the authors.

2. "Plant Cell Culture & Micropropagation", a semestral journal edited by Editora UFLA of the Universidade Federal de Lavras, publishes scientific articles and communications in the area of plant tissue culture, elaborated by researchers of the national and international scientific community. There are no page charges for publication. Submission of a manuscript implies that it is neither under consideration for publication elsewhere nor has appeared previously in part or in whole. On acceptance for publication, authors assign to the Editors full copyright of the manuscript in all languages and countries. Publications will depend on editorial rules and on the review of experts and ad hoc commission. Reviewer and editorial opinions will be anonymously communicated to authors.

3. The articles and communication submitted for publication must be presented in magnetically (3.5") diskette or CDR, using the program Microsoft Word for Windows (version 98, 2000, XP or 2003), written in Portuguese, English or Spanish, using only conventional nomenclature. At the time of submission, authors are required to submit together with the diskette or CDR, 4 (four) hard copies, one original and three copies without the name(s) of the author(s) as well as the footnote on the first page (to be used by the reviewers), printed on A4 white paper (21 cm x 29.7cm) or on continuous form, typewritten only on one side, double spaced using font Times New Roman, size 12, with a 3 cm margin on the left hand side and 2.0 cm margin on the right hand side, 2.5 cm upper and lower margin, 2.5 cm for the heading and 2.5 cm for the footnote. The manuscript must present a maximum of 14 pages. At the time of submission, a cover letter must be sent with the manuscript copies to the Editor requesting publication of the article. This cover letter must be **signed by all authors** and also contain the full address, telephone number and e-mail of the authors. Any inclusion, exclusion or alteration in the authors order must be notified and signed by all authors including the one excluded.

4. Each manuscript must be organized in: a) **TITLE** sufficiently clear; conspicuous and complete, without superfluous words. It is recommended to initiate with the term that represent the most important aspect, with other terms in decreasing of importance; b) **TITLE in Portuguese**; c) **FULL NAME(s) OF THE AUTHOR(s)**, maximum of 6 (six), in capital letters, one after the other in the center of the page, with the footnote of the first page containing their professional qualification or academic training

and their work institution. d) **ABSTRACT** written continuously without paragraph. It must not exceed 250 words. Index terms must be enclosed after the abstract using terms different from those used in the title and separated by comma. The index terms (3 to 5) must be described in capital and small letters, and express the content of the article; e) **ABSTRACT and INDEX TERMS in Portuguese**; f) **INTRODUCTION** (including literature review); g) **MATERIAL AND METHODS**; h) **RESULTS AND DISCUSSION** (it may include tables and figures); i) **CONCLUSIONS** and j) **REFERENCES**.

5. Communication must have the following topics: a) **TITLE**, sufficiently clear, conspicuous and complete, without superfluous words. It is recommended to initiate with the term that represent the most important aspect, with other terms in decreasing of importance; The PORTUGUESE version of the title has to be presented; b) **TITLE in Portuguese**; c) **FULL NAME(s) OF THE AUTHOR(s)**, maximum of 6 (six), in capital letters, one after the other in the center of the page with the footnote of the first page containing their professional qualification or academic training and their work institution; d) **ABSTRACT** written continuously without paragraph. It must not exceed 250 words. Index terms must be enclosed after the abstract using terms different from those used in the title and separated by comma. The index terms (3 to 5) must be described in capital and small letters, and express the content of the article; e) **ABSTRACT and INDEX TERMS in Portuguese**, f) **TEXT** (with no division but must include introduction, material and methods, results and discussion and conclusion (it may include tables and figures) and g) **REFERENCES**.

6. **ACKNOWLEDGEMENTS**: Acknowledgements to people or institutions might be included at the end of the text prior References. The written style must be serious and clear, indicating the reasons of the acknowledgements made.

7. **TABLES AND FIGURES**: must be included right after their citation in the text.

8. **REFERENCES**: references must be cited according to NBR6023/2002 of ABNT. All references and their correct citation in the text are of the entire responsibility of the author(s). **Some important orientations**: all authors of the scientific document must be presented (source); the journal must be cited using its full name; all references must present the name of the city where the journal was published; all references must be cited alphabetically.

**9. PHOTOGRAPHS, GRAPHS, FIGURES, SYMBOLS OR FORMULA CONTAINED IN THE ARTICLE SHOULD OBEY THE FOLLOWING RULES:**

9.1. **Graphs, Figures and/or photographs** must be presented in **black and white**, clear and with contrast, scanned, inserted in the text after their citation and also in a separate file (on the same diskette as the article) **saved in extension ‘tiff’ with resolution of 300 dpi**.

9.2. **Symbols and Chemical Formula** must be presented using a word processor that permits a format for **Page Maker**.

10. The Brazilian Association of Plant Tissue Culture (ABCTP) will inform the author the receipt of the original manuscript and eventually it will also send information regarding its publication. Manuscripts that require modifications will be returned to the author for the respective revision and corrections.

11. Manuscripts not approved will be returned to the author.

12. Articles will be published according to the order of receipt and approval.

13. If any of these rules are not attended the manuscript will be returned to the author.

14. Manuscripts should be sent to the following address:

**ABCTP**  
**Plant Cell Culture & Micropropagation**  
**Universidade Federal de Lavras**  
**Depto. de Biologia - Setor de Fisiologia Vegetal**  
**Caixa Postal: 3037**  
**37200-000 - Lavras – MG**  
**Brazil**