Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

ISSN 1808-9909
Volume 3, Número 2, 2007

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. 3, n. 2, p. 55-107, 2007

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

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>

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
E-mail: abctp@ufla.br

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. Departamento de Biologia. Setor de Fisiologia Vegetal.

CDD (22ª ed.) 580.72405

INDEXADO por:
AGRIS
AGROBASE

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Diretoria

Presidente – Renato Paiva – UFLA
Secretário – Moacir Pasqual – UFLA
Secretário Adjunto – Antônio Carlos Torres – EMBRAPA Hortaliças
Tesoureiro – Guilherme Augusto Canella Gomes – Benger do Brasil

Comissão Editorial

Editor Chefe
Renato Paiva – UFLA

Conselho Editorial
Antônio Carlos Torres – EMBRAPA Hortaliças
Moacir Pasqual – UFLA
Renato Paiva – UFLA

Secretaria
Daiane Peixoto Vargas – UFLA
Leticia Caravita Abbade – UFLA

Nomenclatura Científica
Manuel Losada Gavilanes – UFLA

Revisão de Português
Jane Cherem

Revisão de Inglês
Renato Paiva – UFLA

Revisão de Referências Bibliográficas
Márcio Barbosa de Assis

Editoração Eletrônica
Luciana Carvalho Costa – Editora UFLA
Christyane Aparecida Caetano – Editora UFLA

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

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
Luciana Ribas – UFPR
Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa – UFRN
Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin – UFPR
Miguel Pedro Guerra – UFSC
Miklos Gábor Fári – Universidade de Debrecen – Hungria
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. 3, N.2)
Ana Cardoso Clemente Filha Ferreira de Paula – UNIFENAS
Ana Hortência Fonsêca Castro – UNILAVRAS
Antônio Paulino da Costa Netto – UEMG/PASSOS
Beatriz Appezzato-Da-Glória – ESALQ/USP
Fabiano Guimarães Silva – CEFET/Rio Verde-GO
José Antônio Peters – UFPel
Jose Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA
Leonardo Ferreira Dutra – EMBRAPA
Luiz Antonio Biasi – UFPR
Monique Inês Segeren – Pró-Clone
Norma Albarello – UERJ
Oleg Leontiev-Orlov – URI
Rafael Pio – Unioeste
Rairys Cravo Nogueira – UFPA
Ricardo Tadeu de Faria – UEL
Vespasiano Borges de Paiva Neto – UFMS
Weliton Antônio Bastos de Almeida – UFBA

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

ISSN 1808-9909

Plant Cell Culture & Micropropagation

CONTEÚDO

BAP na multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* spp.
BAP *in vitro* propagation of *Prunus* spp. Rootstocks.
Rangel Viganó Campos, Valmor João Bianchi, Paulo Sérgio Gomes da Rocha, Márcia Wulff Schuch, José Carlos Fachinello 55

Cultivo *in vitro* e aspectos da anatomia foliar de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville Fabaceae – Papilionoideae].
In vitro culture and aspects of leaf anatomy of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville Fabaceae – Papilionoideae.
Ana Hortência Fonsêca Castro, Renato Paiva, Amauri Alves de Alvarenga, Evaristo Mauro de Castro, Stephania Maíra Machado Vitor, Aline Mororó Fernandes 61

Influência de diferentes auxinas na indução e cinética de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* J. F. GMEL. (Unha de Gato).
Influence of different auxins on the induction and kinetic growth of *Uncaria guianensis* J. F. GMEL. (Cat's Claw) callus.
Rita de Cassia Alves Pereira, José Eduardo Brasil Pereira Pinto, Érika Soares Reis, Ricardo Monteiro Corrêa, Suzan Kelly Vilela Bertolluci 69

Ácido giberélico e número de explantes na propagação *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl.
Gibberellic acid and number of explants on *in vitro* propagation of *Cattleya loddigesii* Lindl.
Joyce Dória Rodrigues, Aparecida Gomes de Araujo, Moacir Pasqual, Ester Alice Ferreira, Herminio Souza Rocha, Filipe Almendagna Rodrigues 78

Tipos de explantes e volumes de meio de cultura no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L.
Explant types and culture medium volume *in vitro* grow of *Melissa officinalis* L.
Érika Soares Reis, José Eduardo B. P. Pinto, Luciana Domiciano Silva Rosado, Ricardo Monteiro Corrêa 83

Micropropagação de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., uma planta medicinal.
Micropropagation of *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., a medicinal plant.
Marvin Gerardo Olivas Bonilla, José Eduardo Brasil Pereira Pinto, Érika Soares Reis, Ricardo Monteiro Corrêa, Larissa Corrêa do Bomfim Costa 89

Efeito da concentração de sacarose e qualidade de luz na propagação *in vitro* de plântulas de orquídea.
Effect of sucrose concentration and light quality on the *in vitro* propagation of orchid plantlets.
Aparecida Gomes de Araujo, Moacir Pasqual, Evaristo Mauro de Castro, Filipe Almendagna Rodrigues, Dalilhia Nazaré dos Santos, Leonardo Ferreira Dutra 96

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

Efeito de citocininas na organogênese *in vitro* de folhas e pecíolos de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) cv. Batum.
Effect of cytokinins on *in vitro* organogenesis of leafs and petiole of raspberry (R*ubus idaeus* L.) cv. Batum.
Lorena Pastorini Donini, Joseane Almeida de Souza, Luciane Couto da Silva, Maria Goreti Senna Corrêa, Márcia Wulff Schuch 103

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

BAP NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE PORTA-ENXERTOS DE *Prunus* spp.

BAP *IN VITRO* PROPAGATION OF *Prunus* spp. ROOTSTOCKS

RANGEL VIGANÓ CAMPOS[1], VALMOR JOÃO BIANCHI[2], PAULO SÉRGIO GOMES DA ROCHA[3], MÁRCIA WULFF SCHUCH[4], JOSÉ CARLOS FACHINELLO[4]

[1]Mestre em Agronomia/Fruticultura de Clima Temperado – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – Universidade Federal de Pelotas/UFPel – Cx.P. 354 – 96010-900 – Pelotas, RS – camposrv@hotmail.com
[2]Doutor, Professor do Departamento de Botânica – Universidade Federal de Pelotas/UFPel – Cx. P. 354 – 96010-900 – Capão do Leão, RS – valmorjb@yahoo.com
[3]Doutor em Agronomia, Escola Agrotécnica Federal de Alegre – Cx. P. 118 – 97541-970 – Alegrete, RS – rocha@ufpel.tche.br
[4]Doutor, Professor do Departamento de Fitotecnia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – Universidade Federal de Pelotas/UFPel – Cx. P. 354 – 96010-900 – Pelotas, RS – marciaws@ufpel.tche.br; jfachi@ufpel.tche.br

RESUMO

A multiplicação *in vitro* dos explantes é influenciada pela concentração de citocinina, assim faz-se necessário o ajuste da mesma para otimizar a taxa de multiplicação. Objetivou-se, neste trabalho, verificar o efeito das concentrações de BAP na multiplicação dos porta-enxertos de *Prunus* spp. cvs. Mr. S. 1/8, Mr. S. 1/14 e Julior. O meio de cultura utilizado foi constituído por macronutrientes do meio SH e micronutrientes do meio MS acrescido por 0; 0,3; 0,6 e 0,9 mg L^{-1} de BAP. Os explantes tipo segmento nodal, retirados de brotações estabelecidas em meio MS sem BAP, foram inoculados em frascos contendo 30 mL de meio e em seguida cultivados em sala de crescimento com temperatura de 24 ±1 ºC, fotoperíodo de 16 horas de luz e uma densidade de fluxo luminoso de 27 µmol m^2 s^{-1}. Após 35 dias de cultivo, verificou-se a maior porcentagem de brotação (98,35%) e número médio de brotações formadas por explante (2,44) no porta-enxerto Mr. S. 1/8. À medida que se aumentou a concentração de BAP no meio de cultura, obteve-se um maior número médio de brotações por explantes nos três porta-enxertos, porém houve redução no comprimento das brotações da cv. Mr. S. 1/8. Para obtenção de maiores taxas de multiplicação nos porta-enxertos Mr. S. 1/14 e Julior, devem-se utilizar concentrações de BAP superiores a 0,9 mg L^{-1} ou manter os explantes no meio de multiplicação por um período superior a 35 dias.

Termos para indexação: Cultura de tecidos, micropropagação, 6-benzilaminopurina, produção de mudas.

ABSTRACT

The *in vitro* propagation of explants is influenced by cytokinin which makes its concentration adjustment necessary in order to optimize the multiplication rate. The objective of this work was to verify the effect of BAP concentrations in the multiplication of *Prunus* spp. cvs. Mr. S. 1/8, Mr. S. 1/14 and Julior rootstocks. The culture medium used was consisted by macronutrients of SH medium and micronutrients of MS medium supplemented with 0; 0.3; 0.6 and 0.9 mgL^{-1} BAP. Nodal segment explants were excised from shoots cultured in MS medium without BAP, inoculated in flasks containing 30 mL of culture medium and then maintained in a growth room with temperature of 24±1º C, fotoperiod of 16 hours and a density of luminous flow of 27 µmol m^2s^{-1}. Higher shooting percentage (98.35%) and shoot average number (2.44/explant) was observed on Mr. S. 1/8 rootstocks, after 35 days of cultivation. With the increase on BAP concentration in the culture medium, higher shoot average number was observed in all cultivars however with a reduction on shoot length of the Mr. S. 1/8 cultivar. The use of BAP concentrations higher than 0.9 mgL^{-1} or the maintenance of the explants on multiplication medium more than 35 days promotes higher rates of multiplication.

Index terms: Tissue culture, micropropagation, 6-benzylaminopurine, plant production.

INTRODUÇÃO

Os principais porta-enxertos de pessegueiro utilizados na região Sul do Brasil são das cultivares Capdeboscq e Aldrighi, e eles são altamente suscetíveis ao nematóide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood (COUTO et al., 2004).

Visando ampliar as opções de porta-enxertos para fruteiras de caroço nessa região foram introduzidas as seleções de *Prunus ceracifera* Ehrh. (Mr. S. 1/8 e Mr. S. 1/14) e *Prunus insititia* L. (Julior). As cultivares dessas espécies se destacam por possuírem importantes características agronômicas como resistência a fitonematóides e tolerância a solos úmidos, entre outras (FACHINELLO & LORETI, 2000).

No Brasil, de maneira geral, porta-enxertos para *Prunus* são propagados quase exclusivamente por

(Recebido em 3 de outubro de 2006 e aprovado em 10 de agosto de 2007)

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

sementes, apesar do método de propagação por estaca ser bastante interessante, ele não é viável para a maioria das cultivares por causa da sua baixa porcentagem de enraizamento (SILVA et al., 2003). No caso de espécies de ameixeira (a exemplo de *P. ceracifera* L., *P. domestica* e *P. salicina* Lindl.), a propagação por sementes é considerada inadequada porque as sementes apresentam baixa porcentagem de germinação e por não possibilitam a obtenção de plantas homogêneas no viveiro (RAMOS et al., 2003). Trabalhos de multiplicação pelo método de estaquia foram realizados, mas obtiveram resultados pouco consistentes (dados não divulgados).

As técnicas de micropropagação têm se mostrado viáveis na propagação de algumas espécies frutíferas lenhosas, por possuirem como características principais maior rapidez em relação aos métodos tradicionais de propagação, manutenção das características genéticas e sanidade do material propagado (COUTO, 2003), embora, em algumas espécies do gênero *Prunus*, a taxa de multiplicação obtida seja pequena (RODRIGUES et al., 2003).

A diferença na taxa de multiplicação entre as espécies lenhosas multiplicadas *in vitro*, ocorre porque cada espécie e/ou cultivar possuem características genéticas próprias (PEREIRA & FORTES, 2001). Além disso, a concentração de citocinina livre no tecido vegetal cultivado depende de uma grande variedade de processos bioquímicos como a absorção, distribuição e metabolismo desse regulador de crescimento (AUER et al., 1992).

Uma das formas de aumentar a taxa de multiplicação dos explantes é com o ajuste do protocolo para cada espécie em estudo. Entre os fatores mais importantes para serem ajustados, destacam-se o tipo do meio de cultura, o tipo e a concentração de citocinina (SILVEIRA et al., 2001).

De acordo com Pérez-Tornero et al. (2000), a utilização de uma fonte de citocinina no meio de multiplicação é indispensável para promover a superação da dominância apical do explante e induzir à proliferação de gemas axilares e/ou adventícias.

Das citocininas utilizadas nos meios de multiplicação, a 6-benzilaminopurina (BAP) é considerada mais eficiente e que contribuído substancialmente na indução de gemas axilares adventícias durante a multiplicação dos explantes, além de se destacar das demais por ser mais barata (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Trabalhos de multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus*, buscando avaliar o tipo de meio de cultura e concentração do ágar (RODRIGUES et al., 2003); tipo de meio e concentração de BAP (SILVEIRA et al., 2001) e concentração de BAP e AIB (WAGNER JÚNIOR et al., 2003), possibilitam inferir que os porta-enxertos da espécie *Prunus cerasifera* são mais fácies de multiplicar e apresentam maior taxa de multiplicação, quando comparados com os porta-enxertos da espécies *Prunus pérsica* (L.) Batsch..

Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito de diferentes concentrações de BAP, na multiplicação dos porta-enxertos de *Prunus* spp. cvs. Mr. S. 1/8, Mr. S. 1/14 e Julior.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica – Instituto de Biologia da UFPel, em Pelotas-RS, no período de janeiro a março de 2004.

Foram utilizados como explantes segmentos nodais com aproximadamente 10 mm de comprimento, retirados das brotações dos porta-enxertos de *Prunus* spp. cvs. Mr. S. 1/8, Mr. S. 1/14 e Julior provenientes da fase de estabelecimento *in vitro*, em meio de cultura MS completo, sem reguladores de crescimento.

Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram excisados e inoculados em frascos com capacidade de 250 mL, contendo 30 mL de meio de cultura constituído por macronutrientes do meio SH (SCHENCK & HILDEBRANT, 1972) e micronutrientes do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido por 0; 0,3; 0,6 e 0,9 mg L^{-1} de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,05 mg L^{-1} de ácido indolbutírico

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

(AIB), 100 mg L^{-1} de mioinositol, 30 g L^{-1} de sacarose e 7 g L^{-1} de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,2, antes da adição do ágar. A esterilização do meio de cultura foi realizada em autoclave a 121 ºC, com pressão de 1,5 atm, durante 15 minutos.

Após a inoculação, transferiu-se os fracos contendo os explantes para sala de crescimento com temperatura de 24 ±1 ºC, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons do período de luz de 27 µmol m^2 s^{-1}.

O delineamento experimental utilizado foi um fatorial 3x4 (porta-enxerto x concentração de BAP, respectivamente), inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um frasco contendo quatro explantes.

Após 35 dias de cultivo avaliou-se a porcentagem de explantes brotados, número médio de brotações por explante e comprimento médio das brotações.

Realizou-se a análise de variância dos dados e comparação de médias pelo teste de Duncan ou por regressão polinomial, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa SANEST (ZONTA & MACHADO, 1987). Para a análise estatística dos dados das variáveis expressas em porcentagem realizou-se a transformação segundo arco seno de $(X/100)^{1/2}$. E para a variável número médio de brotações por explante realizou-se a transformação segundo $(x+k)^{1/2}$, sendo K= 0,5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a variável porcentagem de explantes brotados, observou-se diferença significativa apenas para o fator porta-enxerto. As melhores respostas foram obtidas com as cvs. Mr. S. 1/8 (98,30%) e Mr. S. 1/14 (90,64%), as quais não diferiram significativamente entre si, porém o primeiro apresentou a porcentagem de explantes brotados superior a cv. Julior (Tabela 1). Embora a utilização de uma fonte de citocinina, no meio de multiplicação, seja indispensável para promover a superação da dominância apical do explante e induzir a brotação das gemas axilares e/ou adventícias, a concentração necessária para induzir tal processo pode variar de acordo com o tipo de explante e o genótipo utilizado (PÉRES-TORNERO et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2004). Avaliando o tipo de explante na multiplicação do porta-enxerto de *Prunus* cv. Tsukuba, ROCHA (2006) verificou que o ápice caulinar formou a maior porcentagem de brotação (99,5%), em relação ao segmento nodal (3,5%) e que o porcentual de explantes brotados na cv. Mr. S. 2/5 (91,7%) foi superior à cv. Sírio (68,7%).

Com relação ao número médio de brotações, houve efeito significativo do fator porta-enxerto e do fator concentração de BAP, porém sem interação entre os mesmos. Observou-se que o maior número médio de brotações por explante ocorreu na cv. Mr. S. 1/8 (2,44) e que as diferenças não foram significativas entre as cvs. Mr. S. 1/14 e Julior (Tabela 1). Esses resultados observados diferem dos obtidos por Wagner Júnior et al. (2003), que trabalhando com o porta-enxerto cv. Julior, cultivado no meio MS acrescido por 0,6 mg L^{-1} de BAP, obtiveram 5,6 brotações por explante. A diferença observada no número médio de brotações por explante obtidas nos dois trabalhos, possivelmente, deve estar relacionada com o tempo em que os explantes permaneceram no meio de

TABELA 1 – Porcentagem de explantes brotados e número médio de brotações por explante em três porta-enxertos de *Prunus* spp., aos 35 dias de cultivo. Pelotas, RS. 2004.

Porta-enxerto	Explantes brotados (%)	Brotações por explante
Mr. S. 1/8	98,30 a	2,44 a
Mr. S. 1/14	90,64 ab	1,69 b
Julior	84,18 b	1,61 b

*Medias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

multiplicação, pois no presente trabalho avaliou-se aos 35 dias de cultivo enquanto que, no trabalho dos referidos autores, foram avaliados aos 70 dias de cultivo. Por outro lado, as médias obtidas com os três porta-enxertos (Tabela 1) são semelhantes às observadas por Chaves et al. (2005), que trabalhando com os porta-enxertos cvs. Okinawa e Mr. S. 1/8 cultivados no meio MS suplementado com 0,6 mg L^{-1} de BAP, obtiveram 1,5 e 2,9 brotações por explante, respectivamente. As diferenças observadas na porcentagem de explantes brotados e número médio de brotações por explante, possivelmente devem estar relacionadas às características intrínsecas de cada cultivar, pois, de acordo com Pérez-Tornero & Burgos (2000), as respostas dos explantes nos meios de multiplicação podem variar, significativamente, em função do genótipo testado.

Observou-se que o aumento da concentração de BAP no meio de cultura proporcionou crescimento linear no número médio de brotações por explante (Figura 1). Esses resultados estão de acordo com aqueles observados por Chaves et al. (2005), que trabalhando com as cvs. Okinawa e Mr. S. 1/8, no meio MS suplementado por 0; 0,3 e 0,6 mg L^{-1} de BAP, observaram aumento no número brotações por explante, na medida em que a concentração de BAP foi aumentada no meio de cultura. Trabalhando com *Prunus cerasifera* cv. Mr. S. 2/5, cultivada em meio MS acrescido por concentrações que variaram entre 0 mg L^{-1} a 2 mg L^{-1} de BAP, Rocha (2006) observou, que no meio de cultura contendo até 1 mg L^{-1} de BAP, houve crescimento linear no número médio de brotações formadas por explante, e a partir desta concentração observou-se estabilização no número delas.

Embora a adição de uma fonte de citocinina (BAP) seja indispensável no meio de multiplicação para a formação de brotações (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998), nem sempre o aumento na concentração de BAP resulta no maior número de brotações formadas, pois, Teixeira et al. (2004) avaliando o efeito das concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 mg L^{-1}) na multiplicação do porta-enxerto de *Prunus* cv. Carelli, observaram que não houve diferença no número de brotações por explante entre 0,5 e 4 mg L^{-1} de BAP (3,3 e 3,4 brotações/explante, respectivamente). Resultados semelhantes foram obtidos por Rogalski et al. (2003) com a ameixeira cv. Santa Rosa cultivada no meio MS acrescido por concentrações de BAP que variaram de 0,5 a 3 mg L^{-1}, demonstrando que não há diferença no número de brotações entre as concentrações de BAP.

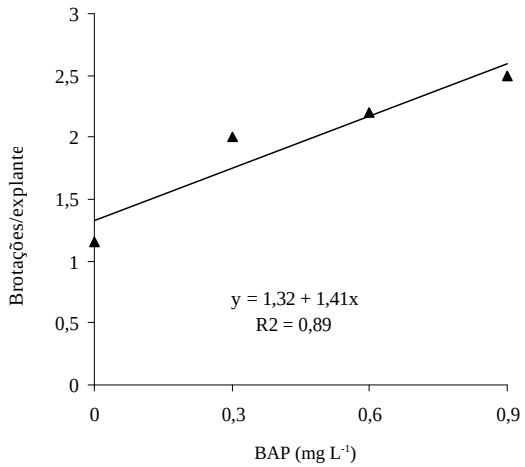

FIGURA 1 – Número médio de brotações formadas por explante dos porta-enxertos de *Prunus* spp., aos 35 dias de cultivo, em meio de cultura acrescido por diferentes concentrações de BAP. Pelotas, RS. 2004.

Para o comprimento médio das brotações, houve interação entre os fatores porta-enxerto e concentração de BAP, observando-se que essa variável no porta-enxerto cv. Mr. S. 1/14 aumentou, à medida em que se incrementou a concentração de BAP no meio de cultura (Figura 2). Esses resultados diferem dos obtidos por Sczepanski (2001), o qual multiplicando a cv. Mirabolano observou que as brotações cultivadas em meios contendo até 0,4 mg L^{-1} de BAP alongaram, mas após essa concentração notou que ocorreu uma paralisação do alongamento.

O meio de cultura adicionado de 0,9 mg L^{-1} de BAP proporcionou os maiores comprimentos médios das brotações das cvs. Mr. S. 1/14 e Julior (Figura 2). Resultados semelhantes foram observados por Wagner Júnior et al. (2003), que multiplicando a cv. Julior, obtiveram o maior comprimento médio das brotações no meio de cultura

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

contendo as maiores concentrações (0,45 e 0,6 mg L^{-1} de BAP). Em relação à cv. Mr. S. 1/8, observou-se que, com o acréscimo das concentrações de BAP no meio de cultivo, houve decréscimo no alongamento das brotações (Figura 2). Esse resultado está de acordo com Lucas (2000), o qual afirma que as citocininas geralmente estimulam a multiplicação e inibem o comprimento das brotações.

O maior comprimento das brotações registrados para a cv. Mr. S. 1/14 e Julior pode estar relacionado com a competição dos explantes por nutrientes, uma vez que o número de brotações por explante foi maior na cv. Mr. S. 1/8, havendo maior competição por nutrientes, o que resultou no menor tamanho de brotações.

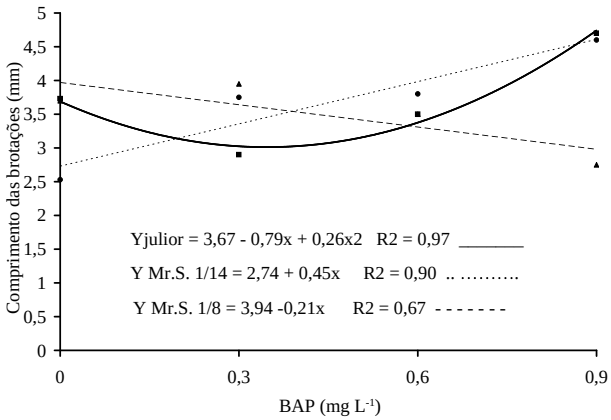

FIGURA 2 – Comprimento médio das brotações de três porta-enxertos de *Prunus* spp., aos 35 dias de cultivo, em meio de cultura acrescido de BAP. Pelotas, RS. 2004.

Podem-se observar distintos comprimentos das brotações dos porta-enxertos, em função da concentração de BAP. Contudo, vale ressaltar que a utilização de altas concentrações de citocinina no meio de cultura poder inibir o alongamento das brotações em prunáceas e também induzir a um distúrbio fisiológico conhecido como vitrificação ou hiperhidricidade (LEONTIEV-ORLOV et al., 2000). Mesmo em se tratando de genótipos com a mesma descendência (Mr. S. 1/8 e Mr. S. 1/14), a resposta diferenciada observada confirma que para cada genótipo existe a necessidade de adaptação do protocolo de multiplicação, pois as concentrações endógenas de citocininas nos explantes certamente são diferenciadas. Em função disso, futuros trabalhos de quantificação de citocinina nos tecidos dos explantes poderão se constituir em importante indicador da necessidade e/ou da quantidade de citocinina que deve ser aplicada exogenamente, visando maximizar as taxas de multiplicação de em cada genótipo.

CONCLUSÕES

Nas condições em que esse experimento foi desenvolvido, concluiu-se que:

- o porta-enxerto cv. Mr. S. 1/8 apresentou maior resposta ao BAP, durante a fase de multiplicação *in vitro*, comparado a Mr. S. 1/14 e Julior;

- concentrações de BAP de até 0,9 mg L^{-1} aumentam o número de brotações da cv. Mr. S. 1/8, porém reduzem o seu comprimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUER, C. A; COHEN, J. D; LALUE, M; COOKE, T. D. Comparison of benzyladenine metabolism in two *Petunia hybrida* lines differing in shoot organogenesis. **Plant Physiology**, Versailles, v. 98, n. 3, p. 1035-1041, 1992.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; FACHINELLO, J. C. Orientação do explante, BAP e meio de cultura na multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus* 'Okinawa' e 'Mr. S. 1/8'. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 47-52, 2005.

COUTO, M. **Propagação *in vitro* dos porta-enxertos híbridos de pessegueiro 'Barrier' e 'Cadman' (*Prunus* sp.)**. 2003. 77f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Pelotas, 2003.

COUTO, M.; OLIVEIRA, R. P.; FORTES, G. N. de L. Multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus* sp. 'Barrier' e 'Cadaman'. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 5-7, 2004.

FACHINELLO, J. C.; LORETI, F. Porta-enxertos para frutas de caroço. I - Novas opções com material de origem clonal, sementes e híbridos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 3, p. 483-486, 2000.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. v. 1, p. 183–260.

LEONTIEV-ORLOV. O.; ROGALSKI, M.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L. 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*Prunus* sp.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 6, p. 63-67, 2000.

LUCAS, M.A.K. **Micropropagação dos cultivares de porta-enxerto de macieira M-9 e M-26 nos sistemas convencional e imersão temporária**. 2000. 54f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2000.

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

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R.L. Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 417-420, 2001.

PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, p. 133-141, 2000.

PÉREZ-TORNERO, O.; LÓPEZ, J.M.; EGEA, J.; BURGOS, L. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 75, n. 3, p. 283-286, 2000.

RAMOS, J. D.; MATOS, L. E. S.; GONTIJO, T. C. A.; JUNQUEIRA, K. P.; SANTOS, F. C. Enraizamento de estacas herbáceas de "Mirabolano" (*Prunus cerasífera* Ehrn) em diferentes substratos e concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 189-191, 2003.

ROCHA, P.S.R. **Propagação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* ssp**. 2006, 101f. Tese (Doutorado em Agronomia - Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Pelotas, 2006.

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 cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 25, n. 1, p. 131-133, 2003.

ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira "Santa Rosa": Efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 365-367, 2003.

SCHENCK, R.U.; HILDEBRANT, A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal**. Ottawa, v. 50, p. 199-204, 1972.

SCZEPANSKI, P.H.G. **Propagação *in vitro* do porta-enxerto de ameixeira Mirabolano** (*Prunus cerasifera* Ehrh.). 2001. 52f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Pelotas, 2001.

SILVA, A. L.; ROGALSKI, M.; MORAES, L. K. A.; FELISBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M. P. Estabelecimento e Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. v. 25, n. 2, p. 297-300. 2003.

SILVEIRA, C. A. P.; FACHINELLO, J. C.; FORTES, G. R. de L.; CITADIN, I.; RODRIGUES, A. C.; QUEZADA, A. C.; SILVA, J. B. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 488-492, 2001.

TEIXEIRA, P. T.; SILVA, A. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; GUERRA, M. P. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* spp. ' Carelli'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. v. 26, n. 2, p. 377-379, 2004.

WAGNER JÚNIOR, A.; COUTO, M.; QUEZADA, A. C. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de ameixeira 'Julior'. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 2, p. 121-124, 2003.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. SANEST - **Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: DMEC/IFM/UFPel, 1987. 138p.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

CULTIVO *IN VITRO* E ASPECTOS DA ANATOMIA FOLIAR DE BARBATIMÃO [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville FABACEAE – PAPILIONOIDEAE]

IN VITRO CULTURE AND ASPECTS OF LEAF ANATOMY OF *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville FABACEAE – PAPILIONOIDEAE

ANA HORTÊNCIA FONSÊCA CASTRO[1], RENATO PAIVA[2], AMAURI ALVES DE ALVARENGA[3], EVARISTO MAURO DE CASTRO[3], STEPHANIA MAÍRA MACHADO VITOR[4], ALINE MORORÓ FERNANDES[5]

[1]Doutora, Professora – Centro Universitário de Lavras/UNILAVRAS – R. Padre José Poggel, 506, Centenário, 37200-000 – Lavras, MG – acastro@unilavras.edu.br
[2]PhD, Professor – Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – renpaiva@ufla.br
[3]Doutor, Professor – Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – amauriaa@ufla.br; emcastro@ufla.br
[4]Bolsista Iniciação Científica/FAPEMIG – Centro Universitário de Lavras/UNILAVRAS – R. Padre José Poggel, 506, Centenário, 37200-000 – Lavras, MG – stephaniamachado@hotmail.com
[5]Acadêmica – Centro Universitário de Lavras/UNILAVRAS – R. Padre José Poggel, 506, Centenário, 37200-000 – Lavras, MG.

RESUMO

Objetivou-se estabelecer uma metodologia de propagação *in vitro*, por via sexuada para o barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville FABACEAE – PAPILIONOIDEAE] e avaliar aspectos da anatomia foliar de plântulas cultivadas *in vitro* e após aclimatização, sementes foram inoculadas em meios MS e WPM, com 100% e 50% da concentração de sais, suplementados com 30 g L^{-1} de sacarose, solidificados com 7 g L^{-1} de ágar e o pH ajustado a 5,7 ± 0,1. Avaliaram-se a porcentagem de oxidação e a contaminação do meio e dos explantes, a porcentagem de sementes germinadas e matéria fresca e seca das plântulas formadas. Folíolos fixados de plântulas cultivadas *in vitro* e com 30 dias de aclimatização foram submetidos a cortes transversais e paradérmicos, corados e montados entre lâmina e lamínula para avaliação de aspectos da anatomia foliar. A porcentagem de germinação foi de 92%, em média, em ambos os meios e maiores acúmulos de matéria fresca e seca foram observados em plântulas cultivadas em meios MS e WPM completos. O estudo da anatomia foliar permitiu a observação de diferenças no contorno e grau de espessamento das paredes das células epidérmicas, densidade e diâmetro dos estômatos e espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso em função do processo de aclimatização adotado.

Termos para indexação: Micropropagação, Planta Medicinal, Cerrado.

ABSTRACT

In order to establish an *in vitro* propagation methodology for *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville FABACEAE–PAPILIONOIDEAE and evaluate leaf anatomy after acclimatization, seeds were inoculated in MS and WPM medium containing 50 or 100% of salt concentration, supplemented with 30 g L^{-1} sucrose, solidified with agar 7 g L^{-1} and pH adjusted to 5.7±0.1. Medium and seed oxidation and contamination percentage, seed germination percentage and fresh and dry matter seedling weight were evaluated. For the anatomic study, transversal and paradermic leaf cuts were performed on leaves cultivated *in vitro* and already acclimatized. The average germination percentage was 92% in both media with higher fresh and dry matter weight observed in seedlings cultivated in 100% MS and WPM medium. The leaf anatomy study showed differences on the contour and on the thickness level of the epidermic cell walls, stomata density and diameter and thickness of the spongy and palisade parenchyma as a function of the used acclimatization process.

Index terms: Micropropagation, Medicinal Plant, Cerrado.

INTRODUÇÃO

Estima-se que o cerrado brasileiro contribua com 10.000 espécies de plantas, das 60.000 fanerógamas distribuídas pelo país (ALMEIDA et al., 1998). O barbatimão [*Stryphnodendron adstringens (*Mart.) Coville] é uma espécie medicinal do cerrado, com elevados teores de compostos polifenólicos na casca, especialmente taninos, em concentrações que variam de 20 a 30% (LIMA, et al. , 1998). Possui grande distribuição e importância econômica para o Estado de Minas Gerais e é empregado popularmente como adstringente e cicatrizante (LOPES et al., 2005), no combate de amigdalite, faringite, hemorróidas, leucorréias, erupções cutâneas, diarréias e como agente

(Recebido em 28 de fevereiro de 2007 e aprovado em 10 de setembro de 2007)

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

antiinflamatório (LIMA et al., 1998; PALAZZO-DE-MELLO et al., 1996).

Segundo Almeida et al. (1998), a produção nacional de casca de *S. adstringens* vem decrescendo desde 1988, principalmente no sul de Minas Gerais, em razão de sua ampla utilização pelas indústrias de curtimento do couro. O barbatimão se regenera na natureza através de sementes, cuja produção ocorre durante poucos meses do ano e o estabelecimento das mudas é prejudicado pelo efeito restritivo do tegumento (BARRADAS & HANDRO, 1974), por condições ambientais desfavoráveis e pelo ataque de patógenos e herbívoros (FRANÇA et al., 1995). De acordo com Fay (1992), a taxa de germinação de sementes de algumas espécies pode aumentar, quando são utilizados métodos de cultura de tecidos, principalmente se as sementes apresentam dormência, endosperma reduzido ou grande infestação por microrganismos.

O estudo anatômico de órgãos vegetativos de plântulas cultivadas *in vitro* fornece informações importantes para o controle da morfogênese e no caso das folhas, indica possíveis alterações em tecidos importantes para rotas metabólicas primárias, especialmente a fotossíntese, além de auxiliar na eficiência de protocolos de micropropagação (ZIV, 1995). Segundo Donnely & Vidaver (1984), em geral, as plantas desenvolvidas *in vitro* apresentam-se pouco lignificadas, com paredes celulares pouco espessadas, abundância de espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido e reduzida quantidade de tecidos de sustentação (esclerênquima e colênquima). As raízes adventícias possuem sistema vascular pouco desenvolvido e em plantas lenhosas e semi-lenhosas, o crescimento secundário não é observado. Como conseqüência, somente uma pequena porcentagem dessas raízes sobrevive à aclimatização.

Fidelis et al. (2000) relatam que, além do aparelho fotossintético ineficiente, as folhas das plântulas produzidas *in vitro* possuem menor quantidade de cera epicuticular e tal fato é responsável pela transpiração excessiva, que, aliada à redução no número de estômatos, funcionamento deficiente no mecanismo de abertura e fechamento estomático e à má estruturação do clorênquima, levam ao dessecamento e murchamento das folhas. Esses fatores são considerados como as causas mais comuns da baixa sobrevivência pós-transplantio.

Objetivou-se neste trabalho estabelecer uma metodologia de propagação *in vitro*, por via sexuada para o barbatimão e avaliar aspectos da anatomia foliar de plântulas cultivadas *in vitro* e após aclimatização.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das sementes e teste de viabilidade

Frutos maduros de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens (*Mart.) Coville – Fabaceae] foram coletados entre agosto e novembro de 2004, em área de Cerrado *sensu stricto*, no município de Ijaci, sul de Minas Gerais, situado a 918 m de altitude, 21º14'S de latitude e longitude 44,9º00'W GRW. Exsicatas do material vegetal encontram-se depositadas no Herbário do Departamento de Biologia da UFLA e registradas sob nº 17227. As sementes foram tratadas com Benomyl a 2% e, após secagem foram armazenadas em câmara fria, à temperatura de 4 ºC, no escuro. Para o teste de viabilidade, 30 sementes foram submetidas ao teste do tetrazólio (NADEEM et al., 2000), imediatamente após a coleta (tempo zero) e após armazenamento por 6 e 12 meses. O padrão de coloração em diferentes regiões foi observado.

Germinação *in vitro* e aclimatização

As sementes foram desinfestadas em NaOCl 2% (hipoclorito de sódio comercial) por 10 minutos, lavadas em água destilada esterilizada e seccionadas parcialmente na região lateral, com bisturi. Em seguida, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL dos meios MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD & MC COWN, 1981), com 100% e 50% da concentração de sais, suplementados com 30 g L^{-1} de sacarose e solidificados com ágar, na proporção de 7 g L^{-1} e o pH ajustado para 5,7 ± 0,1. As sementes foram transferidas para sala de crescimento a 27 ± 1ºC, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 25 mmol m^{-2} s^{-1}, e após 15 dias de inoculação, avaliaram-se a

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

porcentagem de oxidação e a contaminação do meio e dos explantes, e aos 60 dias, avaliou-se a porcentagem de sementes germinadas e matéria fresca e seca das plântulas formadas. A germinação foi avaliada adotando-se critérios fisiológicos, considerando-se germinadas todas as sementes com protrusão de radícula. Empregou-se delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo cada parcela experimental constituída por 10 tubos, com uma semente por tubo. Os dados foram submetidos à análise de variância e analisados estatisticamente utilizando-se o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados (FERREIRA, 2000). Para comparação dos contrastes, entre as médias dos tratamentos foi utilizado o Teste de Scoott e Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade.

Para a aclimatização, adotou-se como referência a metodologia proposta por Castro et al. (2005), onde plântulas cultivadas *in vitro* foram submetidas a diferentes níveis de irradiância (30%, 50% e 70%), por 7 dias cada, com redução concomitante e progressiva da umidade, para incrementar as trocas gasosas. Foram utilizadas no processo plântulas com 6 a 8 semanas de idade, e com 3 a 4 pares de folhas desenvolvidas, germinadas em meios MS e WPM completos.

Aspectos da Anatomia foliar

Os estudos anatômicos foram realizados em plantas cultivadas em meios de cultura completos, por apresentarem maior quantidade de folhas.

Folíolos completamente expandidos, localizados na região mediana do terço superior de plântulas cultivadas *in vitro* e com 30 dias de aclimatização foram coletados, fixados em FAA (formaldeído + álcool etílico + ácido acético) 70% (v/v) e conservados em álcool etílico 70% (v/v), segundo Johansen (1940).

Para a caracterização dos estômatos e demais anexos epidérmicos e avaliação da densidade estomática e medições dos diâmetros polar e equatorial realizaram-se cortes paradérmicos à mão livre, nas epidermes adaxial e abaxial das lâminas foliares. As secções paradérmicas foram montadas em safranina glicerinada 0,1% e observadas em microscópio Olympus CBB, com auxílio de câmara clara, segundo a técnica de Laboriau et al., (1961). Cortes transversais foram submetidos à clarificação em solução de hipoclorito de sódio 20% (v/v do produto comercial), por um período de três a cinco minutos e a três lavagens com água destilada. A coloração foi efetuada utilizando-se uma mistura de azul de astra e safranina, segundo Bukatsh (1972). Realizaram-se medições da espessura das epidermes adaxial e abaxial e dos parênquimas paliçádico e esponjoso, com auxílio de ocular micrométrica OSM. As lâminas foram fotomicrografadas utilizando-se microscópio Olympus BX 60. Empregou-se delineamento inteiramente casualizado, constituído de dez plantas por tratamento, quatro folíolos por planta e 10 repetições por folíolo, sendo cada repetição composta por 3 medidas. As médias foram comparadas e analisadas estatisticamente pelo teste de Scoott e Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Viabilidade: Verificou-se que, em média, 95% das sementes, recentemente coletadas, eram viáveis e que o armazenamento dessas sementes por um período de 12 meses não influenciou sua viabilidade ($p>0,05$) (dados não mostrados).

Germinação *in vitro* e aclimatização

Não houve indício de escurecimento no explante ou no meio de cultura, indicativo de processos oxidativos, comuns no cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. O porcentual de contaminação foi menor que 1%, mostrando a eficiência do processo de desinfestação adotado.

A germinação iniciou-se a partir do quinto dia após a inoculação, em todos os meios de cultivo. A porcentagem foi de 92%, em média, independente dos meios empregados e o seccionamento parcial das sementes foi importante para a quebra da dormência tegumentar, possibilitando altas taxas de germinação, o que corrobora com as observações de Barradas & Handro (1974), que sugerem a necessidade

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

de escarificação mecânica em barbatimão. Uma porcentagem de 72% de germinação foi observada por Nicioli (2006), em sementes não escarificadas, cultivadas em meio MS completo.

Maiores acúmulos de matéria fresca e seca foram observados em plântulas cultivadas em meios MS e WPM completos (Figura 1), sendo estes 25% superiores em relação àqueles observados para plântulas cultivadas em meios com a metade da concentração dos sais. Os altos porcentuais de germinação indicam ausência de relação entre o tipo de meio de cultivo e os níveis de sais no meio. Entretanto, maiores acúmulos de matérias fresca e seca relacionaram-se diretamente com a maior concentração de sais, nos meios empregados. Oliveira (2001) sugere que os meios de cultivo completos permitem uma maior eficiência na utilização da sacarose, que por sua vez, favorece a absorção dos minerais disponíveis.

Os resultados obtidos indicam que as plântulas de barbatimão são exigentes do ponto de vista nutricional, para o seu desenvolvimento mas, segundo Fay (1992) esse comportamento varia de espécie para espécie. Em oliveira (*Olea europaea* L.), estudos realizados a partir do cultivo *in vitro*, demonstraram efeitos lineares significativos sobre a matéria seca das plântulas produzidas em decorrência da variação, na concentração de sais do meio MS (OLIVEIRA, 2001). Castro et al. (2005) relatam que em murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex Juss.), uma espécie lenhosa e medicinal do Cerrado, o uso de meio MS completo, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, proporcionou alto porcentual germinativo dos embriões e plântulas com maior acúmulo de matéria seca.

A porcentagem de sobrevivência das plântulas após o transplantio foi de 93%, valor este superior ao observado por Nicioli (2006), que relata taxas que variam de 41 a 50% de sobrevivência, de acordo com o tipo de substrato empregado. Altas porcentagens de sobrevivência também foram descritas para *Morus acidosa* Griff. (PATTNAIK, et al., 1996), *Ficus religiosa* L. (DESHPANDE, JOSEKUTTY & PRATHAPASENAN, 1998) e *Byrsonima verbascifolia* (CASTRO et al., 2005).

As plântulas cultivadas em ambos os meios de cultura apresentaram maior número de folíolos e sistema radicular bem ramificado, 30 dias após o início do processo de aclimatização. Aos 45 dias de aclimatização, os folíolos apresentavam-se brilhantes, recobertos por ceras epicuticulares e com o aparato fotossintético funcional, em razão do aumento de biomassa das plântulas, observações essas coincidentes com a remoção do último sombrite (dados não mostrados). De acordo com Pattnaik, Sahoo & Chand (1996) e Ziv (1995), essas características são fundamentais para a sobrevivência das plântulas no ambiente *ex vitro* e se não forem atendidas podem conduzir

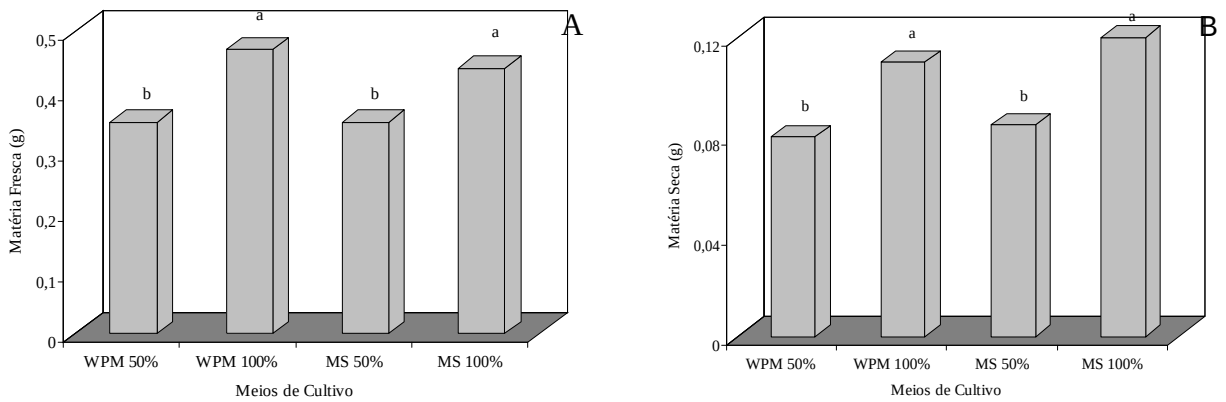

FIGURA 1 – Efeito dos diferentes meios de cultura sobre as plântulas formadas. A. Matéria Fresca; B. Matéria Seca.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

à degeneração metabólica e morfológica. O período de 15 dias, para que as plantas passem para uma condição autotrófica, também é sugerido por Ziv (1995).

Aspectos da Anatomia foliar

A lâmina foliar exibiu organização dorsiventral, hipostomática, com pequena quantidade de tricomas tectores em ambas as faces. Em seções transversais, os folíolos de plântulas propagadas *in vitro* apresentaram na região do terço médio, epidermes adaxial e abaxial uniestratificadas, sem variação na espessura (Tabela 1) e com paredes levemente espessadas pela deposição de uma fina cutícula. Constatou-se a presença de tricomas simples, pluricelulares e com um número variável de duas a quatro células. Em vista frontal, as células epidérmicas apresentaram paredes sinuosas, pouco espessadas, pela deposição de cutina em ambas as faces.

Verificou-se, ao nível do terço médio, que o mesofilo é formado por um parênquima paliçádico organizado em um só estrato na superfície adaxial, com poucos espaços intercelulares, constituído por células alongadas. O parênquima esponjoso apresentou-se com 3 ou 4 estratos voltados para a superfície abaxial, com células arredondadas, que deixam entre si numerosos e pequenos espaços intercelulares de dimensões variáveis, sendo esse parênquima dotado de maior espessura em relação ao paliçádico.

Os estômatos, distribuídos na face abaxial, apresentaram densidade aproximada de 215,32/mm^2. Nessa condição de cultivo, suas dimensões são variáveis, sendo menos elípticos, com menor diferença nos diâmetros polar e equatorial (Tabela 2), produto de sua fase de diferenciação, com predominância de estômatos do tipo anisocítico.

As lâminas foliares de plântulas aclimatizadas exibiram, em corte transversal, a mesma organização das plântulas propagadas *in vitro*. As epidermes adaxial e abaxial apresentaram um arranjo simples, uniestratificado, com variação não significativa em suas espessuras (Tabela 1). As paredes são mais espessas, com maior deposição de cutina. Pequena quantidade de tricomas simples, em ambas as faces pode ser observado. Em secção paradérmica, observam-se células epidérmicas com paredes poligonais, bem espessadas pela deposição de cutina, na face abaxial e com parede sinuosa, na face adaxial. O mesofilo, ao longo

TABELA 1 – Espessura das epidermes adaxial e abaxial e do parênquima paliçádico e esponjoso de folíolos de barbatimão cultivados *in vitro* e após aclimatização.

Tratamentos	Espessura média (μm)			
	Ep. adaxial	**Ep. abaxial**	**P. paliçádico**	**P. esponjoso**
Cultivo *in vitro*	9,93aA	9,93aA	29,76aB	55,23bB
Após aclimatização	10,50aA	9,45aA	45,39aA	77,4bA

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na linha e maiúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Scoott-Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 2 – Diâmetros polar e equatorial dos estômatos de folíolos de barbatimão cultivados *in vitro* e após aclimatização.

Tratamentos	Diâmetros (μm)	
	Polar (DP)	**Equatorial (DE)**
Cultivo *in vitro*	18,57aA	15,98aA
Após aclimatização	20,34aA	13,43bA

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na linha e maiúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Scoott-Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

do terço médio da lâmina foliar, apresenta-se do tipo dorsiventral, com parênquima paliçádico organizado em um só estrato na superfície adaxial, constituído por células mais alongadas quando comparadas com as plântulas propagadas *in vitro*. O parênquima esponjoso constitui-se de cinco estratos na superfície abaxial, com células arredondadas e redução nos espaços intercelulares, sendo esse mais espesso que o parênquima paliçádico (tabela1). Os estômatos são do tipo anisocítico e ocorrem em densidade de 194,15/ mm^2 na epiderme abaxial, com maiores diâmetros polar e equatorial em relação à plântulas propagadas *in vitro* (Tabela 2).

O estudo da anatomia foliar de *S.adstringens* cultivado *in vitro* e após aclimatização permitiu a observação de diferenças no contorno e grau de espessamento das paredes de células epidérmicas, densidade e diâmetro dos estômatos e espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso, em função do processo de aclimatização adotado. Em plântulas aclimatizadas, observou-se ausência de sinuosidade em células epidérmicas da face adaxial, o que, segundo Cassells e Walsh (1994) pode contribuir para tornar as plantas mais susceptíveis à dessecação, comprometendo o estabelecimento *ex vitro*, uma vez que a sinuosidade da parede é relatada como um fator importante na prevenção do colapso parietal, no caso de escassez de água (ALBARELLO et al., 2001). Entretanto, em barbatimão, o maior espessamento da parede em plantas aclimatizadas, parece ter sido fundamental para tornar as plântulas mais tolerantes a uma situação de estresse hídrico.

Os folíolos de *S. adstringens*, cultivados *in vitro*, apresentaram maior densidade estomática e estômatos com menores variações nos diâmetros polar e equatorial, em oposição ao de plântulas aclimatizadas. Esses resultados diferem daqueles encontrados por Nicioli (2006), que não observou diferença significativa na densidade estomática entre plântulas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas, o que foi atribuído a uma transição de características anatômicas. Albarello et al. (2001) relatam que a alta densidade estomática de plantas propagadas *in vitro* é uma característica anatômica correlacionada à maior suceptibilidade à dessecação, o que pode ser revertido durante a aclimatização. Ademais, estômatos com diâmetros polar e equatorial semelhantes, são menos elípticos e, portanto, segundo Johansson et al., (1992), menos funcionais. Alta densidade estomática e estômatos circulares são descritos para *Rubus idaeus* L. (DONNELY E VIDAVER, 1984), *Rosa* sp. (JOHANSSON et al., 1992) e *Rollinia mucosa* Baill. (ALBARELLO et al., 2001).

Uma característica importante ao processo de aclimatização de *S. adstringens* foi a organização do mesofilo, com parênquima paliçádico constituído por células justapostas e a redução dos espaços intercelulares no parênquima esponjoso, o que favoreceu o sucesso da fase de aclimatização. Para Paittnak et al. (1996), a ausência dessa organização representa uma limitação ao processo de micropropagação. Em plântulas propagadas *in vitro* e aclimatizadas, o parênquima esponjoso apresentou maior espessura, por causa da presença de um maior número de camadas de células. Entretanto, é importante destacar que a menor diferença de espessura entre parênquima paliçádico e esponjoso, observado em plântulas aclimatizadas reflete um maior alongamento das células do parênquima paliçádico, o que, segundo Pattnaik et al., (1996) contribui para uma maior eficiência do aparato fotossintético e a sobrevivência das plântulas no ambiente *ex vitro*.

Considerando-se esses resultados, o conhecimento prévio dos aspectos relacionados à anatomia foliar de *S. adstringens* torna promissora e vantajosa o cultivo *in vitro* dessa espécie, garantindo material vegetal em grande escala e com boas condições assépticas para estudos futuros, que explorem suas potencialidades medicinais e proporcionem alternativas para obtenção de metabólitos secundários *in vitro*.

CONCLUSÕES

O armazenamento por um período de 12 meses, não influenciou na viabilidade das sementes.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

As sementes de barbatimão apresentaram alta porcentagem de germinação, independente do tipo de meio de cultivo e da concentração de sais. Entretanto, maiores acúmulos de matéria fresca e seca foram observados em plântulas cultivadas em meios MS e WPM completos.

As diferenças anatômicas observadas no contorno e grau de espessamento das paredes de células epidérmicas, densidade e diâmetro dos estômatos e espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso refletem o sucesso do processo de aclimatização adotado.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro ao projeto e concessão de bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S. F. L.; VIANA, V. R. C.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae) sob condições de cultivo *in vitro* e *in vivo*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 4, n. 1, p. 35-46, 2001.

ALMEIDA, S. P. de; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464p.

BARRADAS, M. M.; HANDRO, W. Algumas observações sobre a germinação da semente de barbatimão, *Stryphnodendron barbadetimam* (Vell.) Mart. (Leguminosae-Mimosoideade). **Boletim de Botânica**, São Paulo, v. 2, p. 139-150, 1974.

BUKATSH, F. Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina. **Microkosmos**, Stuttgart, v. 16, p. 255, 1972.

CASSELLS, A.C.; WALSH, C. The influence of gas permeability of the culture lid on calcium uptake and stomatal function in *Dianthus* microplants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** v. 37, p. 171-178, 1994.

CASTRO, A.H.F.; ALVARENGA, A.A. de; PAIVA, R.; GOMES, G.A.C. Propagação do murici (*Byrsonima verbascifolia*) por cultivo *in vitro* de embriões. **Cultura de Células e Micropropagação de Plantas**, Lavras, v. 1, n. 1, p. 1-7, Jan./Jun. 2005.

DESHPANDE, S. R.; JOSEKUTTY, P. C.; PRATHAPASENAN, L. Plant regeneration from axillary buds of a mature tree of *Ficus religiosa*. **Plant Cell Reports,** New York, v. 17, n. 6/7, p. 571-573, Apr. 1998.

DONNELY, D. J.; VIDAVER, W. E. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. **Journal of the American Society of Horticultural Science,** v. 109, n. 2, p. 172-176, 1984.

FAY, M.F. Conservation of rare and endangered plant using *in vitro* methods. **In Vitro Cell, Development Biology**, v. 28, p. 1-4, 1992.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais. . .** São Carlos, SP: UFSCar/SIB, 2000. p. 255-258.

FIDELIS, I.; CASTRO, E.M. de; PINTO, J.E.B.P.; GAVILANES, M.L.; ARTIAGA, E.J. Características anatômicas de estruturas vegetativas de *Brosimum gaudichaudii* desenvolvidas *in vitro* e *in vivo*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 327-336, Abr./Jun. 2000.

FRANÇA, S. C.; DUARTE, I. B.; MORAES, R. M.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagation of *Stryphnodendron polyphythum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, p. 291-293, 1995.

JOHANSEN, B. A. **Plant microtechnique**. New York:Mc Grawn-Hill, 1940. 433p.

JOHANSSON, M.; KRONESTEDT-ROBARDS, E. C.; ROBARDS, A.W. Rose leaf structure in relation to different stages of micropropagation. **Protoplasma**, v. 66, p. 165-176, 1992.

LABORIAU, L.G; OLIVEIRA, J.G.; SALGADO-LABORIAU, M.I. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Toledo. I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 237-252, 1961.

LIMA, J.C.S., MARTINS, D.T.O.; SOUZA JÚNIOR, P.T. Experimental evaluation of stem bark *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antinflamatory activity. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 218-220, 1998.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

LLOYD, G.; MC COWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1981.

LOPES, G. C.; SANCHES, A. C. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; HERNANDES, L.; PLAZZO-DE-MELLO, J.C.P. de Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovathum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wound in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 265-272, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NADEEM, M.; PALNI, L. M. S.; PUROHIT, A. N.; PANDEY, H.; NANDI, S.K. Propagation and conservation of *Podophyllum hexandrum* Royle: an important medicinal herb. **Biological Conservation,** Oxford, v. 92, n. 1, p. 121-129, Jan.2000.

NICIOLI, P.M. **Micropropagação e aspectos fitoquímicos de calos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] – Fabaceae.** 2006. 89p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, 2006.

OLIVEIRA, A. F. **Enraizamento de estacas semilenhosas e cultura de embriões *in vitro* de oliveira** (*Olea europaea* L.). 2001. 122 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, 2001.

PALAZZO-DE-MELLO, J. C.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry,** v. 41, n. 3, p. 807-817, 1996.

PATTNAIK, S. R.; SAHOO, Y.; CHAND, P. K. Micropropagation of a fruit tree, *Morus australis* **Plant Cell Reports,** New York, v. 15, n. 3/4, p. 841-845, Dec.1996.

SCOOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

ZIV, M. ***In vitro* acclimatization.** In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T. SMITH, M. L. A. (Ed.). Automation and environmental control in plant tissue culture. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 493-516.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES AUXINAS NA INDUÇÃO E CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE CALOS DE *Uncaria guianensis* J. F. GMEL. (UNHA DE GATO)

INFLUENCE OF DIFFERENT AUXINS ON THE INDUCTION AND KINETIC GROWTH OF *Uncaria guianensis* J. F. GMEL. (CAT'S CLAW) CALLUS

RITA DE CASSIA ALVES PEREIRA[1], JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO[2], ÉRIKA SOARES REIS[3], RICARDO MONTEIRO CORRÊA[4], SUZAN KELLY VILELA BERTOLLUCI[2]

[1]Engenheira Agrônoma, Pesquisadora Embrapa Agroindústria Tropical – R. Dra. Sara Mesquita 2270 – Bairro Pici – Cx. P. 3761 – Fortaleza, CE – cassia@cnpat.embrapa.br.
[2]Professores do Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – jeduardo@ufla.br; suzan@ufla.br
[3]Mestre em Fitotecnia, Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – erikasreis@yahoo.com.br
[4]Doutorando em Fitotecnia, Departamento de Agricultura – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – ricardomonc7@yahoo.com.br

RESUMO

Entre as diversas plantas medicinais encontradas na Amazônia destaca-se a *Uncaria guianensis* J. F. GMEL., popularmente conhecida por unha de gato. Suas propriedades medicinais são atribuídas a efeitos imuno-estimulantes, antiinflamatórios e inibidores do crescimento de células cancerígenas. A espécie está sendo ameaçada de extinção principalmente por causa das coletas indiscriminadas. Objetivou-se, no trabalho, avaliar a influência de diferentes auxinas (Picloram, ANA, 2,4-D e AIB) na indução e na cinética de crescimento de calos de *Uncaria guianensis*. Segmentos foliares (1 cm^2) de plantas *in vivo* e *in vitro*, após desinfestados, foram cultivados em meio MS, suplementado com várias concentrações de auxinas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4x4), sendo 4 reguladores de crescimento e 4 concentrações de cada regulador (0, 0,5; 1,0 e 2,0 mg L^{-1}). A melhor resposta na indução de calos foi obtida com picloram na concentração de 1,47 mg L^{-1} obtida de acordo com a curva de regressão quadrática ajustada. O início da estabilização da curva de crescimento de calos entre as diferentes auxinas foi diferenciado, ou seja, calos cultivados com picloram estabilizaram o crescimento aos 25 dias de cultivo e calos cultivados em meio com 2,4-D, ANA e AIB estabilizaram aos 30 dias de cultivo.

Termos para indexação: Reguladores de crescimento, Cultura de tecido, Planta medicinal.

ABSTRACT

Among several medicinal plants from the Amazon, *Uncaria guianensis* J. F. GMEL. specie known as "Cat's claw" is considered prominent. Its medicinal properties are attributed to inimunostimulating effect, antinflammatories and cancerigenic cells growth inhibitors. This species is considered as undangerous due to its indiscriminate harvest. The objective of this work was to evaluate the effect of different auxins (Picloram, NAA, 2,4-D and IBA) on the induction and at the kinetic growth of *Uncaria guianensis* callus. Leaf segments (1 cm^2) harvested from plants grown *in vivo* and *in vitro* were cultivated in MS medium supplemented with different concentrations of auxins. The best callus induction was obtained using 1.47 mgL^{-1} picloram according with the adjusted square regression curve. Stabilization of the initial callus growth curve was differentiated within the used auxins. While callus cultivated with picloran stabilized growth with 25 days of culture, callus cultivated in the presence of 2,4-D, NAA and IBA stabilized growth with 30 days of culture.

Index terms: Growth regulators, tissue culture, medicinal plant.

INTRODUÇÃO

Uncaria guianensis J. F. GMEL. destaca-se por sua comprovada atividade antiinflamatória e antioxidante. As cascas do caule e folhas são comercializadas *in natura* e apresentam alcalóides oxindólicos, N-oxi-oxindólicos e indólicos, triterpenos glucosilados, taninos e flavonóides (LAUS & KEPLINGER, 2003).

A comercialização em larga escala dessa espécie, através de coleta natural da planta torna-se inviável, pelo risco de extinção, pois a mesma ocorre na floresta amazônica, sendo coletada com 8 anos de idade (VILCHES, 1997).

Sistemas de cultura de calos e células vegetais representam uma fonte potencial renovável de valiosos metabólitos medicinais, flavorizantes, essências e corantes que não podem ser produzidos por células microbianas ou

(Recebido em 08 de dezembro de 2005 e aprovado em 20 de novembro de 2007)

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

síntese química. Porém, atualmente poucas culturas produzem esses compostos em quantidades úteis comercialmente (DORNEMBURG & KNORR, 1995).

Pesquisas têm demonstrado sucesso na produção de metabólicos secundários em diferentes órgãos e culturas não organizadas como calos e suspensão de células (SCHRIPSEMA & VERPOORTE, 1994; KARAM et al., 2003; FURDEN et al., 2005; GYORGY et al., 2005).

Portanto, por causa da escassez de trabalhos com a espécie *Uncaria guianensis*, há necessidade de estudos sobre indução de calos e estabelecimento da curva de crescimento, visando estudos futuros na ativação de moléculas secundárias *in vitro*.

Objetivou-se, aqui, verificar a influência de diferentes auxinas, sob diferentes concentrações na indução, manutenção e cinética de crescimento de calos de *Uncaria guianensis*, provenientes de segmentos foliares *in vivo* e *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Efeito de diferentes concentrações e tipos de auxina na indução de calos, em explantes foliares oriundos de plantas *in vivo*

A espécie em estudo foi classificada como *Uncaria guianensis* J. F. GMEL. e as exsicatas estão depositadas no herbário do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre, sob registro Nº 15.640.

Segmentos foliares (1 cm^2) foram retirados de mudas obtidas através da germinação *in vivo* de sementes de *Uncaria guianensis*, coletadas no município de Boca do Acre-AM. As sementes foram colocadas para germinar em bandejas de isopor com substrato Plantmax®, em casa de vegetação.

As mudas foram pulverizadas com solução de benomil (2 g L^{-1}) e as folhas foram imersas em hipoclorito de sódio (1,25% de principio ativo), por 15 minutos e em seguida lavadas com água destilada esterilizada.

Das folhas desinfestadas foram retirados segmentos foliares de 1 cm^2 e inoculadas em frascos de 300 mL, em câmara de fluxo laminar contendo meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com 3% de sacarose solidificado com 0,6% de ágar, onde posteriormente os frascos foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 1ºC, densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 15 mmol m^2 s^{-1} e fotoperíodo de 16 horas.

Os tratamentos consistiram de quatro auxinas (2,4-D, Picloram, AIB e ANA) sob várias concentrações (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L^{-1}).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4x4), sendo 4 reguladores de crescimento e 4 concentrações de cada regulador. A parcela experimental foi constituída por cinco repetições, sendo uma delas constituída de quatro frascos, com quatro segmentos foliares cada.

Após 50 dias de cultivo, avaliou-se a porcentagem de indução e matéria seca de calos.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando software Sisvar® (FERREIRA, 2000).

Concentrações de Picloram na indução de calos oriundos de explantes foliares *in vitro*

Sementes de unha de gato foram lavadas em água corrente, por 10 minutos e posteriormente desinfetadas em câmara de fluxo laminar com solução de hipoclorito de sódio (1,25%), durante 15 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas quatro vezes com água destilada e autoclavada para remoção do excesso da solução desinfetante. Os embriões foram excisados e inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS, solidificado com 6,0 g L^{-1} de agar e 15 g L^{-1} de sacarose. O pH do meio foi ajustado em 5,7, antes da autoclavagem. Após a inoculação, os embriões foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 1ºC, densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 15 mmol m^2 s^{-1} e fotoperíodo de 16 horas.

Segmentos foliares (1 cm^2) retirados de plântulas com 45 dias, foram excisados e inoculados em frascos contendo 15 mL de meio básico MS com 6 g L^{-1} de ágar, 30 g L^{-1} de sacarose, suplementado com 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L^{-1} de picloram.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Após 50 dias de cultivo, avaliou-se a área dos explantes coberta com calos atribuindo-se as notas 1, 2, 3, 4, correspondendo a 25, 50, 75 e 100% respectivamente da área coberta e matérias fresca e seca.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos (níveis de picloram) e cinco repetições, sendo cada repetição constituída de quatro frascos, com quatro explantes/frasco. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando software Sisvar® (FERREIRA, 2000).

Efeito de diferentes auxinas no crescimento cinético da cultura de calos de *Uncaria guianensis*

Calos de 1cm² e matéria fresca média de 2,6 g obtidos a partir de explantes foliares, cultivados em meio MS, suplementado com diferentes auxinas (2,4-D, Picloram, ANA e AIB), na concentração de 1,5 mg L^{-1} foram subcultivados quatro vezes, em intervalos de 30 dias.

Após a quarta repicagem, estabeleceu-se a curva de crescimento dos calos através da determinação da matéria fresca e seca dos calos, respectivamente em intervalos de cinco dias, durante 40 dias.

O índice de crescimento dos calos foi estabelecido através da seguinte relação:

$$\text{I.C} = \frac{\text{Matéria seca final} - \text{Matéria seca inicial}}{\text{Matéria seca inicial}}$$

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, constituído por 4 reguladores de crescimento e 8 intervalos de avaliação (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, e 40 dias).

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando software Sisvar® (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes concentrações e tipos de auxina na indução de calos em explantes foliares oriundos de plantas *in vivo*

Houve efeito significativo da interação auxinas e concentrações na porcentagem de indução e matéria seca de calos ($p<0,05$).

Observou-se que não houve indução de calos em meios de cultura sem auxinas, indicando a importância dos reguladores de crescimento exógenos para indução da divisão celular e, conseqüentemente, a formação de calos para essa espécie.

Houve a formação de calos em explantes de *U. guianensis*, sob todas as auxinas testadas. As respostas na indução variaram conforme o tipo e concentração de auxina no meio. As diferentes respostas na calogênese em meios suplementados com as diferentes auxinas demonstraram a importância desses reguladores na indução e crescimento de calos. As melhores respostas na porcentagem de indução foi obtida com a utilização de 2,4-D e picloram no meio de cultura. O 2,4-D proporcionou resposta linerar na indução de calos, ou seja, à medida que aumentaram as concentrações desse fitoregulador, aumentou também a porcentagem de indução de calos. Já o picloram proporcionou resposta quadrática na indução de calos, ou seja à medida que aumentaram as concentrações de picloram aumentou a percentagem de indução até a concentração de 1,2 mg L^{-1}, que correspondeu ao ponto de máximo da curva (52% de indução). As concentrações superiores a 1,2 mg L^{-1} de picloram tenderam a reduzir significativamente a porcentagem de indução de calos. Para as demais auxinas, não houve efeito significativo na indução de calos, embora tenha ocorrido pequena porcentagem de indução, que variou de 0 a 10% (Figura 1).

Em relação à matéria seca de calos observou-se resposta semelhante à obtida na porcentagem de indução. As melhores respostas na matéria seca de calos foi obtida em meios com 2,4-D e picloram, sendo melhor resposta a obtida na presença de picloram. Maior matéria seca de calos foi obtida em meio acrescido de picloram, sendo 1,1 mg L^{-1} a concentração que proporcionou máximo peso seco de calos (0,31 g). Concentrações superiores a 1,1 mg L^{-1} de picloram reduziram significativamente a matéria seca de calos. 2,4-D também proporcionou significativa matéria seca de calos, embora inferior ao picloram (Figura 1). Já as auxinas ANA e AIB proporcionaram os menores valores de matéria seca de calos sendo o efeito dos níveis de reguladores não significativos para essa variável.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

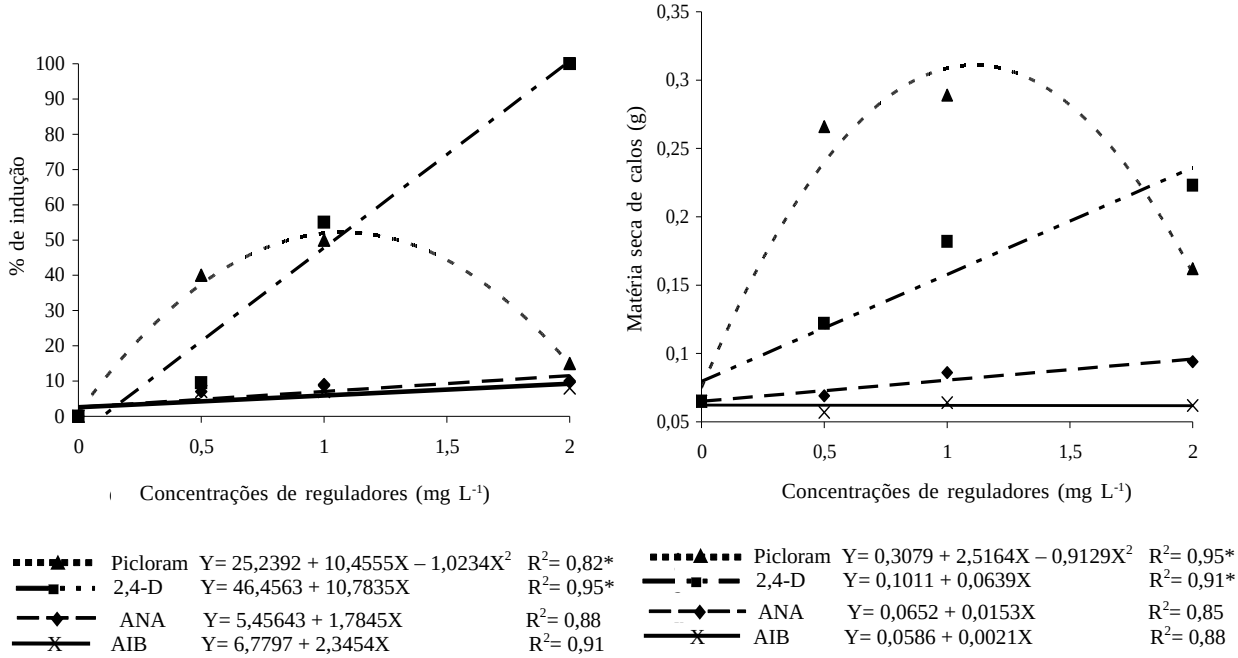

FIGURA 1 – Percentagem de indução e matéria seca de calos induzidos a partir de explantes foliares oriundos de plantas *in vivo* em função de tipos e níveis de auxinas.
* Significativo ao nível de 5%, pelo teste de F.

Segundo Stella (2002) as auxinas têm efeitos biológicos diferentes no explante, sendo ANA e AIB mais efetivas na indução de raiz, enquanto 2,4-D e picloram mais eficientes na indução de calos. Assim, a escolha do fitoregulador ou da concentração dependerá do tipo de crescimento e do desenvolvimento requerido, do nível endógeno de auxina no explante, da capacidade do tecido em sintetizar naturalmente a auxina e da interação entre auxinas sintética e endógena no tecido.

Os calos obtidos na presença de auxinas variaram em coloração e consistência (dados não apresentados). Observou-se que o meio com picloram proporcionou a formação de calos com aspecto friável, enquanto nos meios com 2,4-D, ANA e AIB ocorreu a formação de calos com aspecto compacto. Quanto à coloração, os calos oriundos de meios com picloram tiveram a cor verde-clara. No meio com 2,4-D os calos foram de cor verde-escuro; no meio com ANA, os calos foram de cor creme e no meio com AIB os calos foram de cor marrom.

Pesquisa de Mok e Mok (1977) relataram maior porcentagem de indução e matéria seca de calos em diferentes espécies e variedades de *Phaseolus*, onde melhores respostas foram obtidas na presença de picloram do que com 2,4-D no meio de cultivo. Isto evidencia que as respostas na indução e crescimento de calos, em diferentes espécies, é função do tipo e concentração de fitoregulador utilizado no meio.

Thengane et al. (2003) obtiveram resultados semelhantes ao do presente trabalho para a espécie *Nothapodytes foetida* (Wight) Sleumer, onde eles observaram que a adição de diferentes auxinas como ANA, picloram e 2,4-D, no meio de cultura, influenciou significativamente na porcentagem de indução, coloração e consistência dos calos evidenciando também que essas respostas variam conforme o genótipo, tipo e níveis de fitoreguladores.

Em milheto foi observado aumento na porcentagem de indução de calos com o aumento da concentração de

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

picloram de 0,5 a 3,0 mg L^{-1} (efeito linear), proporcionando porcentagens de indução que variaram de 64 a 96% respectivamente (KAUR & KOTHARI, 2004). No presente trabalho, tanto a porcentagem de indução de calos quanto a matéria seca de calos foram reduzidas significativamente, após determinada concentração de picloram (1,2 mg L^{-1} para porcentagem de indução e 1,1 mg L^{-1} para matéria seca) - efeito quadrático - evidenciando também que a indução e crescimento de calos depende, entre outros fatores, do genótipo e do nível de regulador. Outras pesquisas como de Tang & Newton, 2005 relataram que, para *Pinus strobus* L., meios com 2,4-D, ANA e AIA proporcionaram maior crescimento de calos até a concentração de 3 mg L^{-1}, sendo que a partir dessa concentração a resposta foi decrescente.

Concentrações de picloram na indução de calos oriundos de explantes foliares *in vitro*

Observou-se efeito significativo das doses de picloram na percentagem da área foliar coberta com calos ($p<0,05$). A elevação das doses de picloram no meio proporcionou aumento da porcentagem da área coberta com calos até a concentração de 1,47 mg L^{-1}, correspondente ao ponto de máximo da curva (efeito quadrático). A partir dessa concentração houve tendência de redução da porcentagem de indução de calos (Figura 2A). Não houve formação significativa de calos na ausência de picloram, evidenciando que esse fitoregulador proporciona maior atividade metabólica nas células, induzindo à proliferação de células calosas.

Em relação à matéria fresca e seca de calos foi obervado também efeito quadrático das doses de picloram para essas variáveis. A matéria fresca teve incrementos crescentes até a concentração de de 1,52 mg L^{-1} (ponto de máximo da curva). Já a matéria seca obteve maior incremento na concentração de 1,2 mg L^{-1} (Figura 2B).

Maiores incrementos de matéria seca foram obtidos na concentração de 2,07 µM de picloram, conforme ilustra a Tabela 2.

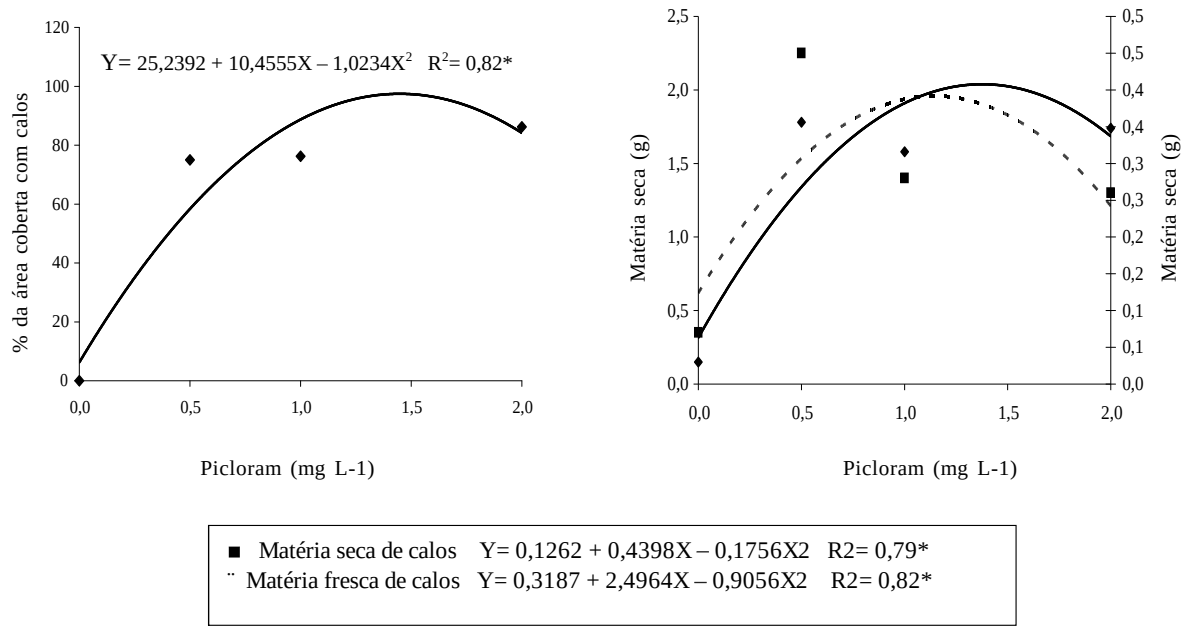

FIGURA 2 – Percentagem da área foliar coberta com calos (A) e matéria seca de calos (B) de *U. guianensis*, induzidos em explantes foliares de plantas *in vitro* em função de concentrações de picloram.
* Significativo ao nível de 5%, pelo teste de F.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Com relação à coloração dos calos, observou-se que os calos obtidos nos tratamentos correspondentes às diversas concentrações de picloram foram de cor verde-claro e consistência friável (dados não apresentados).

Calos com coloração clara e aspecto friável também foi observado por Stella & Braga (2002), em *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. (Rubiaceae), onde os explantes foliares foram cultivados em meio contendo 4 mg L^{-1} de picloram, evidenciando que o picloram é eficiente na indução de calos de muitas espécies.

Efeito de auxinas no crescimento cinético da cultura de calos de *Uncaria guianensis*

O crescimento das células de *Uncaria guianensis* em meio MS, suplementado com 1,5 mg L^{-1} das auxinas 2,4-D, picloram, ANA e AIB tenderam a desenvolver crescimento sigmóide (Figuras 3 e 4).

A auxina 2,4-D proporcionou entre os dias 0 e 5 pós inoculação crescimento ascendente da cultura de células de *U. guianensis*, evidenciando pequena fase lag. Maior matéria seca de calos foi obtida próximo aos 30 dias após a inoculação dos explantes foliares, ocorrendo após essa fase tendência de redução de matéria seca (Figura 3A). A estabilização da curva de crescimento foi observada aos 30 dias pós-inoculação, demonstrando que, nessa fase, faz-se necessária a repicagem dos calos para novo meio de cultivo.

Observou-se que a matéria seca de calos, cultivados em meio com picloram, entre o dia zero até o dia cinco de cultivo teve um crescimento lento (menor inclinação da curva). Os calos, cultivados em meio com picloram, tenderam a uma maior fase lag, demonstrando que as células estavam em fase de preparação para a divisão celular (Figura 3 A). Após 25 dias de cultivo observou-se a estabilização da curva de crescimento de calos.

No entanto, no meio suplementado com AIB e ANA, a fase lag das matérias seca e fresca tenderam a ser mais inclinada em relação às curvas para 2,4-D e picloram, evidenciando que as células já estavam em fase de maior preparação para divisão celular. Semelhante à resposta obtida para o 2,4-D, observou-se que a curva de crescimento de calos das auxinas AIB e ANA tenderam a estabilizar-se próximo aos 30 dias de cultivo (Figura 4).

A curva de crescimento de calos varia em função da espécie e tipo de regulador de crescimento. Calos induzidos a partir de explantes foliares de plântulas *in vitro* têm tendência para desenvolver curva de crescimento acelerada e com aspecto sigmóide. A identificação correta do período de repicagem dos calos, de acordo com a curva de crescimento, é importante para maximizar o processo de multiplicação das células visto que, na fase de crescimento (crescimento ascendente da curva), as células mantêm alta

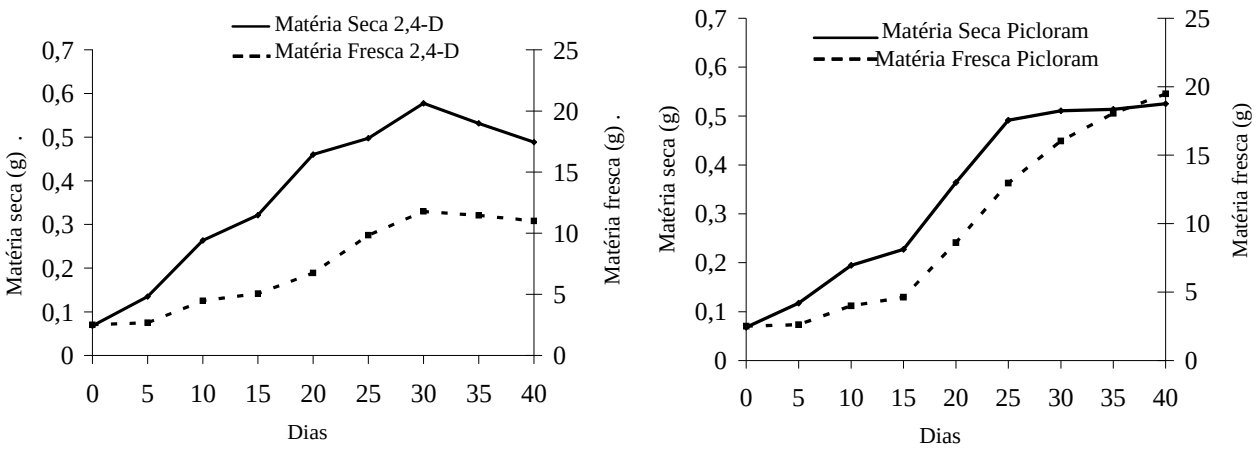

FIGURA 3 – Crescimento cinético de calos de *Uncaria guianensis* a partir da matéria fresca e seca cultivados em (A) 2,4-D e (B) Picloram, ambos na concentração de 1,5 mg L^{-1}.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

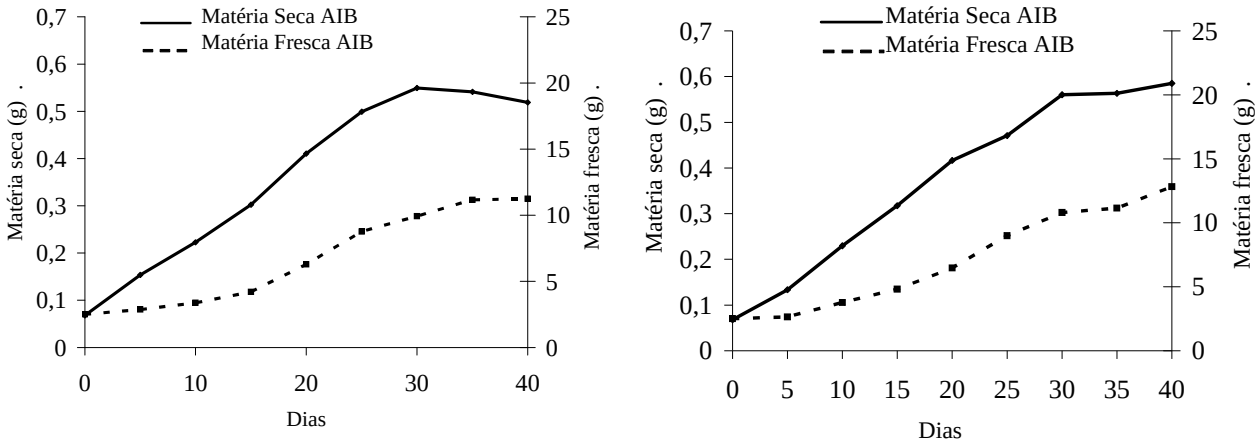

FIGURA 4 – Crescimento cinético de calos de *Uncaria guianensis* a partir de matéria fresca e seca cultivados em (A) AIB e (B) ANA, ambos na concentração de 1,5 mg L^{-1}.

capacidade de divisão. Após o período de crescimento, as células entram na fase estacionária onde há um maior número de células com menor capacidade de divisão celular, e a célula entra em estágio de diferenciação celular.

A matéria fresca é um indicador da friabilidade dos calos. A matéria fresca de calos, cultivados em meio com picloram, foi superior em relação aos calos obtidos em meio com 2,4-D, AIB e ANA (Figuras 3 e 4), evidenciando que os calos obtidos em meio com picloram foram mais friáveis que calos cultivados com as demais auxinas.

Com relação ao índice de crescimento de calos foi observado aumento gradual da massa de calos, em função das diferentes auxinas estudadas.

O índice de crescimento tendeu a um ganho rápido da massa de calos até os 30 dias de cultivo, quando foram utilizadas as auxinas ANA, AIB e 2,4-D. A partir desse período, o índice de crescimento de calos nas diferentes auxinas manteve-se estável (Figura 5). Próximo aos 30 dias observou-se que o índice de crescimento de calos cultivados em picloram manteve-se em 6,0, ocorrendo a partir desse ponto estabilização do índice de crescimento. Porém para os reguladores ANA, 2,4-D e AIB a fase de estabilização iniciou-se aos 30 dias com índice de crescimento 6,5; 6,5, e 6,9 para ANA, 2,4-D e AIB, respectivamente.

O ganho de massa de calos varia conforme a espécie vegetal. Calos da espécie *Nathapodytes foetida* cultivados com picloram desenvolveram aumento gradual da massa de calos até 60 dias pós-inoculação (THENGANE et al.,2003). Pesquisas com a espécie *Salvia fruticosa* tiveram um ganho de massa até os 35 dias (KARAM et al., 2003). Isso sugere diferentes estágios de repicagem para manutenção de calos ao utilizar-se diferentes auxinas. Nesse trabalho com unha de gato, a utilização de picloram no meio de cultivo evidenciou que a repicagem dos calos deve ser feita próximo aos 25 dias de cultivo. Para AIB, ANA e 2,4-D a repicagem deve ser feita aos 30 dias após a inoculação do explante secundário no meio de manutenção.

No meio suplementado com ANA, AIB e 2,4-D foi observado maior ganho em menor período de tempo até os 15 dias, em relação aos calos cultivados em meio com picloram. O crescimento de calos em meio com picloram até a fase estacionária (25 dias de cultivo) foi de 7,22 vezes maior do que o calo inicial. Após esse período, até 40 dias de cultivo, houve apenas um pequeno ganho de 0,5 vez, evidenciando que não há mais crescimento significativo após 25 dias de cultivo. Já para as auxinas ANA, 2,4-D e AIB até a fase de estabilização (30 dias), houve ganho de 8,24; 8,49 e 8,08 vezes, respectivamente em relação ao calo inicial. Após esse período, até 40 dias, houve também

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

ganho não significativo de crescimento para ANA, 2,4-D e AIB (0,36 vez). Assim, foi observado que para *U. Guianensis*, a suplementação das auxinas picloram, 2,4-D, AIB e ANA, no meio de cultura, não proporcionou crescimento significativo de calos após 30 dias de cultivo.

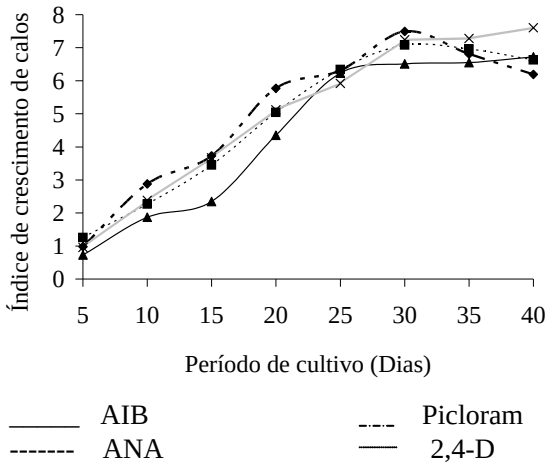

FIGURA 5 – Índice de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* para a matéria seca de calos (g) cultivados nas seguintes auxinas: Picloram, AIB, 2,4-D e ANA na concentração de 6,2 μM durante 40 dias de cultivo.

CONCLUSÕES

Meios de cultura sem reguladores de crescimento não induzem calos em *Uncaria guianensis.*

A melhor auxina para indução e manutenção de calo friável é o picloram.

A repicagem do calo utilizando picloram deve ser feita aos 25 dias e para as demais auxinas deve ser realizada aos 30 dias após a inoculação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DORNEMBURG, H.; KNORR, D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. **Enzime and Microbial Tecnology**, Woburn, v.17, n.8, p.674-685, 1995.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. Anais... São Carlos:UFSCar, 2000. p. 255-258.

FURDEN, B. V.; HUMBURG, A.; FUSS, E. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. **Plant Cell Reports.** v. 24, p. 312-317, 2005.

GYORGY, Z.; TOLONEN, A.; NEUBAUER, P.; HOHTOLA, A. Enhanced biotransformation capacity of *Rhodiola rosea* callus cultures for glycosid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 83, p. 129-135, 2005.

KARAM, N. S.; JAWAD, M. F.; ARIKAT, N. A.; SHIBLI, R. A. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. **Plant Cell, Tissue and organ culture,** Dordrecht, v.73, p. 117-121, 2003.

KAUR, P.; KOTHARI, S.L. *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram im combination with kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** Dordrecht, v. 77, p. 73-79, 2004.

LAUS, G.; KEPLINGER, K. Alkaloids of Peruvian *Uncaria guianensis* (Rubiaceae). **Phyton Annales Rei Botanicae,** v. 43, p.1-8. 2003.

MOK, M. C; MOK, D. W. Genotypic responses to auxins in tissue culture of *Phaseolus*. **Physiology Plantarum,** Copenhagen, v.40, p.261-264, 1977.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum,** Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-493, 1962.

SCHRIPSEMA, J.; VERPOORTE, R. Primary and secondary metabolism of plants and plant cell cultures III Special Issue. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.38, n.2, p23-28, 1994.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

STELLA, A.; BRAGA, M. R. Callus and cell suspension culture of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 68, n. 3, p. 271-276, 2002.

TANG, W.; NEWTON, R.J. Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobus* L.). **Plant Cell Reports,** v.24, p.1-9, 2005.

THENGANE, S.R.; KULKARNI, D.K.; SHRIKHANDE, V.A.; JOSHI, S.P.; SONAWANE, K.B.; KRISHNAMURTHY, K.V. Influence of medium composition on callus induction and camptothecins(s) accumulation in *Nothapodytes foetida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 72, p. 247-251, 2003.

VILCHES, L. E. O. Uña de Gato. Género Uncaria. **Estúdios Botánicos, Químicos y Farmacológicos de Uncaria tomentosa y Uncaria guianensis**. 3ª. ed. Lima: Instituto de Fitoterapia Americano, 1997. 169 p.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

ÁCIDO GIBERÉLICO E NÚMERO DE EXPLANTES NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Cattleya loddigesii* Lindl.

GIBBERELLIC ACID AND NUMBER OF EXPLANTS ON *IN VITRO* PROPAGATION OF *Cattleya loddigesii* Lindl.

JOYCE DÓRIA RODRIGUES[1], APARECIDA GOMES DE ARAUJO[2], MOACIR PASQUAL[3], ESTER ALICE FERREIRA[4], HERMINIO SOUZA ROCHA[5], FILIPE ALMENDAGNA RODRIGUES[6]

[1]Mestranda em Agronomia/Fisiologia Vegetal – Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – Lavras, MG – joycerodrigues01@yahoo.com.br
[2]Pós-doutoranda – Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – Lavras, MG – agaraujo2003@yahoo.com.br
[3]Doutor, Professor – Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – Lavras, MG – mpasqual@ufla.br
[4]Doutora, Pesquisadora – Empresa de Pesquisas Agropecuárias de Minas Gerais/EPAMIG – Av. José Cândido da Silveira, 1647 – Cidade Nova – Belo Horizonte, MG – 31170-000 – ester@epamig.br
[5]Doutorando em Fitopatologia – Departamento de Fitopatologia/DFP – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – Lavras, MG – hermínio@uflanet.com.br
[6]Graduando em Agronomia, bolsista da FAPEMIG – Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras – Cx. P. 3037 – Lavras, MG – felipealmendagna@yahoo.com.br

RESUMO

A propagação vegetativa utilizando técnicas de cultura de tecidos pode ser um valioso instrumento na produção de mudas de orquídea. Objetivou-se determinar a concentração de ácido giberélico e o número de plântulas por frasco, que proporcionem melhor crescimento *in vitro* de plântulas da orquídea *Cattleya loddigesii* Lindl. Plântulas provenientes de sementes germinadas *in vitro*, com aproximadamente 1 cm de comprimento, foram inoculadas em frascos com capacidade para 250cm³ e contendo 50mL de meio de cultura Knudson C acrescido de GA_3 (0; 2,5; 5; 7,5; 10mg L^{-1}), na densidade de 3, 6, 9 ou 12 plântulas por frasco. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com irradiância em torno de 35ìmol m^{-2} s^{-1}, temperatura de 25±1°C e fotoperíodo de 16 horas diárias. Ao final de 90 dias, observou-se que os melhores resultados para propagação *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* foram obtidos com a utilização de 3 plântulas por frasco. Para obtenção de plântulas com maior comprimento, é necessária a adição de 10,0 mg L^{-1} de GA_3 ao meio Knudson C.

Termos para indexação: Orchidaceae, cultura de tecidos, crescimento *in vitro*.

ABSTRACT

Vegetative propagation using tissue culture techniques may be considered a valuable tool for the production of orchid plants. The objective of this work was to determine the best gibberellic acid and the number of explants per flask that result in the best *in vitro* growth of *Cattleya loddigesii* Lindl. seedlings. 3, 6, 9 or 12 seedlings obtained from *in vitro* germinated seeds with approximately 1cm in length were inoculated in flasks containing Knudson C culture medium supplemented with different concentrations (0; 2.5; 5; 7.5 and 10 mgL^{-1}) of GA_3. The seedlings were maintained in a growth room with 35 ìmol $m^{-2}s^{-1}$ irradiance, temperature of 25±1° C and 16h photoperiod. After 90 days of culture, the best results were obtained with the use of 3 seedlings per flask. Plants with higher length are obtained in the presence of 10 mgL^{-1} GA_3.

Index terms: Orchidaceae, tissue culture, *in vitro* growth.

INTRODUÇÃO

O gênero *Cattleya* possui aproximadamente 48 espécies (MORALES, 2006), distribuídas por diversas regiões tropicais das Américas do Sul e Central, caracteriza-se pelos pseudobulbos cilíndricos, com alguns nós e folhas apicais e carnudas. A inflorescência é, em geral, racemosa, com 3 a 6 flores, entre 8 a 11 cm de envergadura e com espata na base. As flores são grandes e muito vistosas. Não são plantas parasitas, pois não se alimentam do hospedeiro, apenas o utilizam para fins de fixação. São plantas epífitas (raízes aéreas) de regiões elevadas e de matas com elevado grau de umidade (MILLER & WARREN, 1996).

A exótica beleza das orquídeas tropicais atraiu a coleta predatória entre os séculos XVI e XX (ALZUGARAY & ALZUGARAY, 1993). A preocupação crescente com a preservação do meio ambiente, associada ao emprego da técnica de propagação *in vitro*, possibilita a expectativa de que as coletas predatórias das orquídeas sejam

(Recebido em 31 de maio de 2006 e aprovado em 20 de janeiro de 2008)

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

minimizadas, permitindo-se assim a manutenção das populações naturais dessas plantas.

A propagação vegetativa utilizando técnicas de cultura de tecidos pode ser um valioso instrumento na multiplicação rápida de mudas de orquídea, uma vez que o processo convencional não atende às necessidades comerciais, por ser muito lento. Os fatores que mais freqüentemente determinam o sucesso dessa técnica são a origem do explante e o meio nutritivo onde são cultivados (PASQUAL et al., 1997). O crescimento e o padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos são determinados por fatores como a composição dos meios de cultivo e a suplementação de reguladores de crescimento (CALDAS et al., 1998).

Para uma otimização do processo de propagação, uma alternativa viável seria o uso de um volume adequado de meio de cultivo e da dose certa de um hormônio de crescimento que atuasse no alongamento de plântulas de orquídea. Nesse contexto, citam-se as giberelinas, e entre elas o GA_3, que é utilizado no alongamento das partes aéreas e diversos efeitos que variam de acordo com cada espécie. Em alguns casos, o GA_3 pode não apresentar efeito ou inibir o desenvolvimento (CALDAS, et al., 1998; EARLE & LANGHANS, 1974; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; PAIVA et al., 1997). Em plantas como macela (*Egletes viscosa* (L.) Less.), a concentração de 0,5 mg L^{-1} proporcionou satisfatório crescimento dos explantes (DINIZ et al., 2003), o que foi também observado por Corrêa et al. (1991) e Luz et al. (1994). Resultados semelhantes foram obtidos por SILVA (2001) com a utilização de 10 mg L^{-1} de GA_2 em gloxínia (*Sinningia speciosa* Hiern.), registrando maior número de folhas e maior número de brotos. Entretanto, a adição de GA_3 ao meio de cultura não proporcionou incremento no tamanho e no número de brotos novos em crisântemo (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat) Kitam.) (OLIVEIRA, 1994).

Nesse sentido objetivou-se neste trabalho determinar a concentração de ácido giberélico e o número de plântulas, por frasco, que proporcionassem melhor crescimento *in vitro*, de plântulas de orquídea (*Cattleya loddgesii*) obtidas a partir da germinação *in vitro* das sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas de *Cattleya loddigesii*, obtidas através de germinação *in vitro* de sementes oriundas de autofecundação, foram submetidas à uniformização em meio Knudson C (KNUDSON, 1946), durante três meses. Após esse período, em cada frasco de 250 mL, contendo aproximadamente 50 mL do mesmo meio Knudson C acrescido de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg.L^{-1} de ácido giberélico, foram colocadas 3, 6, 9 ou 12 plântulas, com aproximadamente 1 cm de comprimento, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar. O meio teve seu pH ajustado para 5.8 ± 0.1 e foi solidificado com 4% de ágar antes do processo de autoclavagem a 121ºC, 1 atm, por 20 minutos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1ºC e fotoperíodo de 16 horas, com intensidade luminosa de 35 µmol m^{-2} s^{-1}. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x5, com quatro repetições de um frasco cada. Decorridos 90 dias de cultivo, analisou-se o número de folhas, comprimento da maior raiz, comprimento da parte aérea, massa fresca de raízes e parte aérea, massa seca de raiz e parte aérea. Os dados foram comparados por meio de regressão polinomial, utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variável número de folhas apresentou significância apenas com o fator número de plântulas. Maior número de folhas (15,08) foi obtido com a utilização de 3 plântulas/frasco (Tabela 1). Provavelmente, como resultado do aumento da disponibilidade de nutrientes por plântula. Embora a utilização de 10 mg L^{-1} de GA_3 promova aumento no número de folhas e na altura de brotos de gloxínia (SILVA, 2001), a ausência do efeito de GA_3 sobre *C. loddgesii* pode estar associado ao fato de que o GA_3 foi esterilizado por autoclavagem, o que pode ter causado uma diminuição na sua concentração, pois, segundo Caldas et al (1990), algumas substâncias orgânicas, como o GA_3, são degradadas pelo calor e precisam ser esterilizadas em filtros especiais tipo Millipore.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

TABELA 1 – Número de folhas e massa fresca de raiz por plântula de *Cattleya loddgesii*, independente da concentração de giberelina.

Número de plântulas	Número de folhas	Massa fresca de raiz (g)
3	15,08 a	0,1188 a
6	10,75 b	0,0652 b
9	8,53 c	0,0487 b
12	7,82 d	0,0458 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade.

Houve significância da interação entre número de plântulas e concentração de GA_3 quanto ao comprimento médio da parte aérea. Os melhores resultados (1,09 cm) foram observados com a utilização de 10,0 mg L^{-1}. Não houve efeito significativo para as concentrações 0 e 2,5 mg L^{-1} (Figura 1). A adição de GA_3, em diferentes concentrações ao meio Knudson C, influenciou o desenvolvimento da parte aérea de maneira significativa, com a utilização de 3 plântulas por frasco, concordando com resultados obtidos por Araújo et al. (2005), que trabalhando com orquídea (*Laeliocattleya* x *Cattleya walkeriana*), verificaram melhores respostas para altura de plântulas em meio WPM com 10 mg L^{-1} de GA_3. Da mesma forma, Moreira et al. (2005), obtiveram maior alongamento de plântulas de *Cattleya aclandiae*Lindl. com a utilização de 1 mg L^{-1} de GA_3 associado a 0,5 mg L^{-1} de ANA. Por outro lado, Santana et al. (2005), verificaram melhores resultados para alongamento das brotações de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) e de gloxínia na ausência de GA_3 (SILVA, 2001).

Aparentemente, a adição de 10 mg L^{-1}de GA_3 aumenta significativamente o comprimento da parte aérea somente quando se utiliza 3 plântulas/frasco, provavelmente porque, sob número reduzido de plântulas e maior concentração de GA_3, há maior disponibilidade do regulador por plântula, mesmo que parte dele seja degradado pela autoclavagem.

Para massa fresca como para massa seca de raiz, não houve interação significativa. Houve significância apenas para os fatores isolados. Verificou-se maior massa fresca de raiz (0,1188g), com a utilização de 3 plântulas/ frasco (Tabela 1), independente da concentração de GA_3.

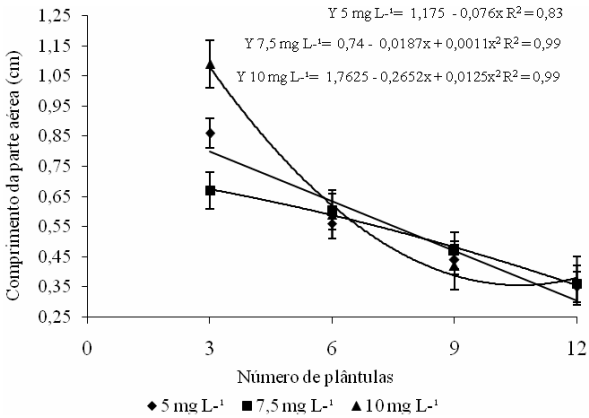

FIGURA 1 – Comprimento médio da parte aérea de plântulas de *C. loddigesii* em diferentes concentrações de GA_3, quando são utilizadas 3, 6, 9 e 12 plântulas/frasco.

O melhor resultado para a massa fresca de raiz (0,200 g) e para massa seca (0,01g) é obtido na ausência de GA_3. O aumento nas concentrações de giberelina estabelece tendência de redução na massa fresca e seca de raiz (Figura 2A e 2B).

Segundo Mitra & Bose (1991), existem respostas diferentes entre espécies e variedades da mesma espécie quanto à utilização de reguladores de crescimento.

Tanto para massa fresca quanto para massa seca da parte aérea houve significância apenas para o fator número de plântulas. Observou-se maior massa fresca (0,191g) e seca (0,072g) com a utilização de 3 plântulas/frasco (Tabela 2), independente do uso ou não de GA_3. De forma similar, Araújo et al. (2005), testando GA_3 em orquídea *Laeliocattleya* x *Cattleya walkeriana*, e Silva (2001) em gloxínia, verificaram melhores resultados para produção de massa fresca de plântulas, na ausência desse regulador de crescimento.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

TABELA 2 – Massa fresca e seca de parte aérea por plântula de orquídea *C. loddigesii*, com diferentes números de plântulas por frasco, independente da concentração de giberelina.

Número de plântulas	Massa fresca de parte aérea (g)	Massa seca de parte aérea (g)
3	0,191 a	0,072 a
6	0,170 b	0,047 b
9	0,167 c	0,031 c
12	0,159 d	0,030 c

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, significativamente, pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade.

CONCLUSÃO

Melhores resultados para propagação *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* são obtidos com a utilização de 3 plântulas por frasco. Para obtenção de plântulas com maior comprimento é necessária a adição de 10,0 mg L^{-1} de GA_3 ao meio Knudson C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C. (Ed.). **Como cultivar orquídeas.** Rio de Janeiro: Três Livros e Fascículos, 1983. 34 p.

ARAUJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; RODRIGUES, V. A.; FERREIRA, A. L. Meios de cultura e GA_3 no cultivo *in vitro* de um híbrido de orquídea. **Horticultura Brasileira** , Brasília, v. 23, n. 2, p. 612. 2005.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA/ CNPH, 1998. v. 1. p. 87-132.

CORRÊA, D. M. et al. Concentrações de ácido giberélico e de ácido naftalênico na propagação *in vitro* de macieira 'Fugi'. **Ciência e prática**, Lavras, v. 15, n. 1, p. 26-31, 1991.

DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. A.; TEIXEIRA, A. A.; GOMES, E. D.; HERNANDEZ, F. F. Ácido giberélico (GA_3) e 6-benzilaminopurina (BAP) no crescimento *in vitro* de Macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.]. **Ciência e Agrotecnologia,** Lavras.v. 27, n. 4, p. 934-938, 2003.

EARLE, E. D.; LANGHANS, R. W. Propagation of *Crysanthemum in vitro* II. Production, growth and flowering of plants from tissue culture. **Journal of American Society for Horticulturae Science,** Alexandria, v. 99, n. 4, p. 352-358, 1974.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para windows versão 4.0. In: REUNIAO ANUAL DA REGIAO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos: UFSCAR, 2000. V. 1. 258 p. p.225.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A. C.et al. **Cultura de tecidos e transformação de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletim**, West Palm Beach, v. 14, p. 214- 217, 1946.

MILLER, D.; WARREN, R. **Orquídeas do Alto da Serra**. Rio de Janeiro: Salamandra; v. 1, 1996, p. 200-228.

MITRA, S. K.; BOSE, T. K. Metabolic changes during adventitious root formation in Ethrel and IBA treated cutting of Litchi. **The Indian Journal of Horticulture,** Bangalore, v. 48, n. 2, p. 105-107, 1991.

MORALES, W. T.; ***Cattleya Loddgesii* LINDLEY.** Disponível em: <http://www.vivabrazil.com/cattleya_loddigesii_lindley.htm > Acesso em: 20 abril 2006.

MOREIRA, M. J. S.; BASTOS, L. P.; TELES, S.; COSTA, M. A. P. C.; ALMEIDA, W. A B. Efeito de giberelina e auxina no alongamento *in vitro* de *Cattleya aclandeae*. **Horticultura Brasileira**, Brasilia, v. 23, n. 2, p. 655. 2005.

OLIVEIRA, P. D. **Propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tezlev.) cv. Orange Reagen.** 1994. 116f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Escola Superior de Agricultura de Lavras. 1994.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

PAIVA, P. D. O. et al. Efeito do ácido naftaleno acético e GA_3 na micropropagação de violeta. **Revista Ceres,** Viçosa, v. 44, n. 254, p. 92-398, 1997.

PASQUAL, M. et al. **Cultura de tecidos vegetais:** tecnologia e aplicações. Meios de cultura. Lavras-MG: UFLA/FAEPE, 1997. 127 p.

SANTANA, W. M. S.; COSTA, A. S.; MENDONCA, A. B.; BLANK, M. F. A.; BLANK, R. I. A. F. Influência do acido giberélico no alongamento de brotações *in vitro* de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Horticultura Brasileira**, Brasilia, v. 23, n. 2, p. 510, 2005.

SILVA, A. B. **Efeito de diferentes concentrações de BAP e GA_3 na multiplicação *in vitro* de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lodd. Hiern.).** 2001. 87f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

TIPOS DE EXPLANTES E VOLUMES DE MEIO DE CULTURA NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Melissa officinalis* L.

EXPLANT TYPES AND CULTURE MEDIUM VOLUME *IN VITRO* GROW OF *Melissa officinalis* L.

ÉRIKA SOARES REIS[1], JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO[2],
LUCIANA DOMICIANO SILVA ROSADO[3], RICARDO MONTEIRO CORRÊA[4]

[1]Mestre, Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – erikasreis@yahoo.com.br
[2]Doutor, Professor – Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – jeduardo@ufla.br
[3]Mestranda em Fitotecnia – Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – lusrosado@yahoo.com.br
[4]Doutorando em Fitotecnia – Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – ricardomonc7@yahoo.com.br

RESUMO

Objetivou-se no presente trabalho avaliar os tipos de explante e volumes de meio na micropropagação de *Melissa officinalis* L.. Três tipos de explantes: segmento apical, segmento nodal de origem mediana e segmento nodal de origem basal e quatro volumes de meio MS: 10, 20, 30 e 40 ml foram avaliados. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, sendo o primeiro composto por 7 repetições e 4 tubos por repetição e o segundo com 5 repetições com 5 frascos. Após 30 dias foram avaliados no primeiro e no segundo experimento o número médio de brotos, número médio de nós e comprimento médio do maior broto e no segundo também o número médio de raízes principais e taxa de sobrevivência. Para o tipo de explante observou-se que os segmentos nodais obtidos das posições mediana e basal produziram um maior número de brotos e o segmento apical produziu brotos com maior número de nós e maior comprimento. Com relação ao volume de meio constatou-se que houve influência significativa no número de nós e o comprimento da maior brotação.

Termos para indexação: Planta medicinal, cultura de tecidos, micropropagação, *Melissa officinalis*.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate explant type and medium volume on *in vitro* propagation the *Melissa officinalis* L.. Three explant types: apical segment, nodal segment of medium origin and nodal segment of basal origin and four volumes of MS medium: 10, 20, 30 and 40 mL were evaluated. Two experiments were performed on a completely randomized design, with the first composed by 7 replicates and 4 tubes per replicate and the second with 5 replicates and 5 flasks. After 30 days, average shoot number, average nodal number and average length of the higher shoot were evaluated on the first and second experiments; for the second experiment, average number of main roots and survival rate were also evaluated. For the type of explant, it was observed that basal and medium nodal segments produced a higher number of shoots and the apical segment, shoots with higher length and node number. Medium volume showed a significant influence on node number and length of the highest shoot.

Index terms: Medicinal plant, tissue culture, micropropagation.

INTRODUÇÃO

Melissa officinalis L. conhecida popularmente como erva cidreira, é uma planta de origem mediterrânica e asiática, da família Lamiaceae, arbustiva podendo atingir de 20 a 80 cm de altura. As folhas são verde-intenso na parte superior e verde-claro na parte inferior. As flores, quando surgem, são brancas ou amareladas, podendo se tornar rosadas com o passar do tempo (MARTINS et al. 1998).

Acredita-se que a melissa apresenta inúmeras propriedades medicinais: é usada para diminuir gases e cólicas, estimula a transpiração, é calmante, sedativa, digestiva, age contra a insônia, enxaqueca, tensão nervosa, ansiedade e ajuda nos casos de traumatismo emocional (MARTINS et al. 1998).

Na micropropagação de uma espécie, o primeiro passo é o estabelecimento *in vitro* de plantas, o que se inicia com a seleção dos explantes mais adequados. Verificando a regeneração *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims) Crespo et al. (2003) estudou três tipos de explantes (basal, mediano e apical) e observou

(Recebido em 13 de abril de 2007 e aprovado em 11 de fevereiro de 2008)

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

que o explante apical produziu maior número de brotos, de nós, número de folhas, maior altura de brotos e maior número de raízes.

Murashige (1977), afirmou que quanto menor o explante, menor a quantidade de meio a ser utilizado. Para ápices caulinares de batata-doce e batata, 4 ml de meio líquido é suficiente para a diferenciação e crescimento inicial, entretanto, em culturas estabelecidas, a taxa de crescimento é diretamente proporcional a quantidade de meio.

Carvalho et al. (1995), estudando a influência de fatores físicos no desenvolvimento e crescimento *in vitro* de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Poir.), verificaram que 10 ml de meio de cultura por frasco com quatro explantes, proporcionou maior formação de gemas em relação aos volumes de 20 e 30 ml. A quantidade de meio e o tipo de recipiente utilizados são variáveis que têm merecido pouca atenção. Grattapaglia & Machado (1998) afirmam que essas variáveis afetam diretamente a área superficial da interface meio-atmosfera, o volume de ar sobre o meio e a profundidade do meio. No cultivo *in vitro* de plantas diversos explantes podem ser utilizados, devendo ser estudado esse fator para cada espécie.

Assim, objetivo-se, no presente trabalho, verificar a influência do volume de meio e do tipo de explante, na micropropagação de *Melissa officinalis* L.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento I: Tipos de explante

O experimento foi constituído de três tratamentos: segmento apical, segmento nodal proveniente de região mediana e segmento nodal proveniente de região basal, com aproximadamente 1 cm de comprimento cada. Os segmentos utilizados foram obtidos de plântulas pré-estabelecidas a partir de germinação de sementes *in vitro*, sendo eles inoculados verticalmente em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 12 ml de meio MS por tubo. Os tubos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento a uma temperatura de 26 ± 1ºC e um fotoperíodo de 16 horas, sob uma intensidade luminosa de 25 µmol m^{-2} s^{-1}.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo cada tratamento composto por 7 repetições e 4 tubos por repetição, totalizando 28 tubos por parcela.

A avaliação foi realizada 30 dias após a inoculação dos explantes, sendo avaliado número médio de brotos, número médio de nós e comprimento médio do maior broto.

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2000).

Experimento II: Volumes de meio

Segmentos nodais obtidos da região mediana de plântulas de melissa pré-estabelecidas a partir de germinação de sementes *in vitro*, foram utilizados como fonte de explantes. Foram inoculados verticalmente cinco explantes, de aproximadamente 1 cm de comprimento, por frasco. Cada frasco possuía um volume interno de 300ml, onde foram adicionados os diferentes volumes de meio: 10, 20, 30 e 40 ml.

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), semi-sólido com 6% de agar e autoclavado em autoclave horizontal a uma temperatura de 120ºC ± 1ºC e pressão de 1atm por 20 minutos.

Os frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento a uma temperatura de 26 ± 1ºC, fotoperíodo de 16 horas, sob uma intensidade luminosa de 25 µmol m^{-2} s^{-1}.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo cada tratamento composto por 5 repetições e 5 frascos por repetição.

A avaliação foi realizada 30 dias após a inoculação dos explantes, sendo avaliado número médio de brotos, número médio de nós, comprimento médio do maior broto, número médio de raízes principais e a taxa de sobrevivência.

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: Tipos de explante

Os diferentes tipos de explante influenciaram significativamente nas variáveis analisadas ($p<0,05$).

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Para a variável número médio de brotos, os segmentos nodais provenientes das regiões mediana e basal produziram melhores resultados (1,85 e 1,89 brotos, respectivamente) sendo que no segmento apical houve menor produção de brotos (1,07 brotos), conforme observa-se na Figura 1 A.

Com relação ao número de nós, o segmento apical produziu plântulas com um maior número (4,62 nós por plântula), já para os segmentos nodais provenientes das regiões mediana e basal o número de nós foi menor (3,14 e 2,74 nós por plântula, respectivamente) como se pode observar na Figura 1 B.

Assim, pode-se inferir que o menor número de brotos foi produzido pelo segmento apical em razão do balanço hormonal entre auxinas e citocininas, que induz à forte dominância apical, onde houve a formação, em média, de aproximadamente um broto por planta. Já no segmento nodal, tanto da região mediana quanto basal da planta, havia a presença de duas gemas laterais, consequentemente produzindo em média, aproximadamente, dois novos brotos por planta.

Taiz & Zeiger (2004) afirmam que o segmento apical possui um balanço hormonal que induz forte dominância apical na formação da planta. Isso explica o fato desse explante apresentar maior número médio de segmentos nodais por brotação, demonstrando a compensação na distribuição da biomassa produzida, em conseqüência de as plantas originadas desse segmento nodal apresentarem menor número de brotações.

A partir destes resultados pôde-se calcular o estande final de plântulas obtidas após 180 dias de cultivo (6 subcultivos em intervalos de 30 dias). Considerando-se um segmento apical como explante inicial devido à produção de um maior número de nós (4,62 nós) (Figura 3) e considerando as razões de multiplicação dos segmentos mediano (3,14 nós) e basal (2,74 nós), pode-se obter, ao longo de 180 dias, 1574 plântulas.

Resultados semelhantes foram observados para a variável comprimento do maior broto, onde um maior comprimento foi obtido de segmentos apicais, produzindo plântulas que apresentaram em média 9,1 cm. Já para os segmentos nodais obtidos da região mediana e basal os comprimentos foram menores, ou seja, em média 4,46 e 3,22 cm, respectivamente (Figura 2).

Segundo Torres et al. (1998), gemas apicais normalmente apresentam maior capacidade de crescimento do que gemas axilares, em razão do efeito da dominância apical. Entretanto é freqüente a opção pelo uso de gemas axilares, em função de ocorrerem em maior número por planta-matriz.

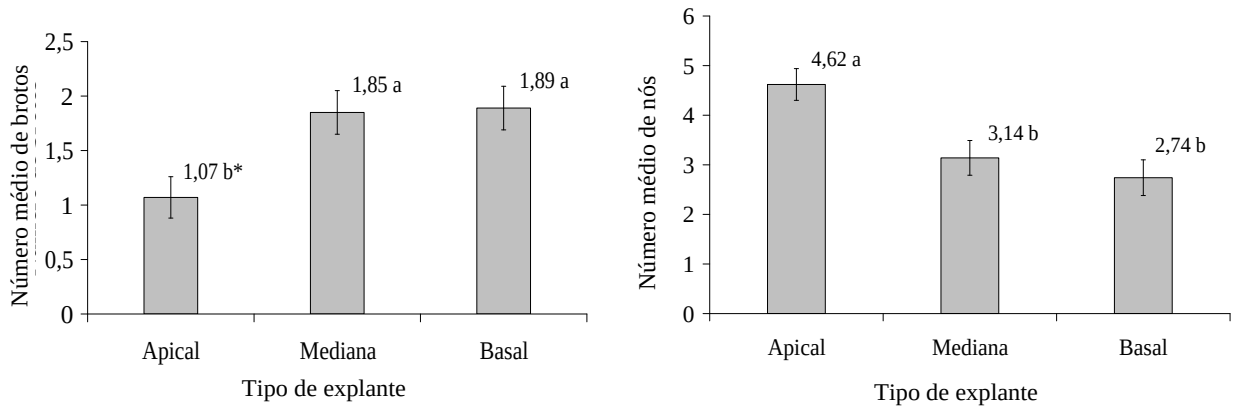

FIGURA 1 – (A) Número médio de brotos e (B) número médio de nós de *Melissa officinalis* em função do tipo de explante após 30 dias de cultivo. * As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste Scott & Knott, ao nível de 5% de probabilidade.
As barras indicam o desvio-padrão de cada tratamento.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

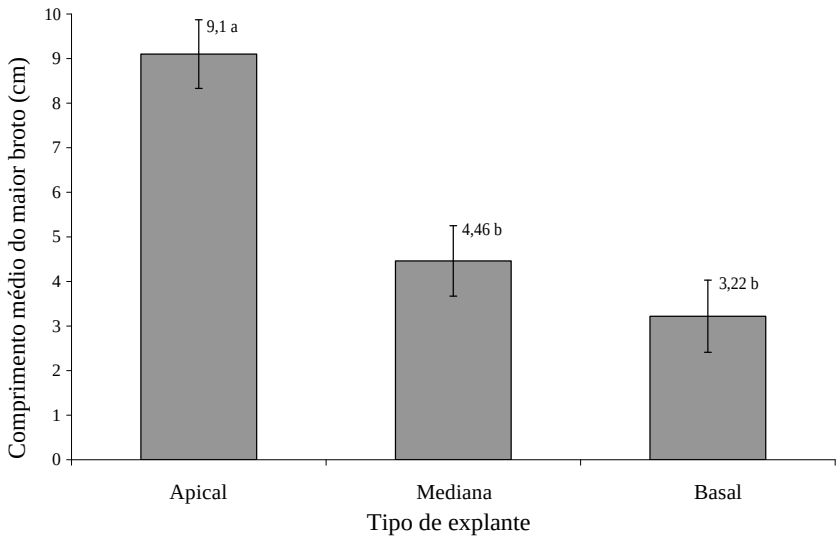

FIGURA 2 – Comprimento médio do maior broto de *Melissa officinalis* em função da posição do explante retirado na plântula. * As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste Scott & Knott, ao nível de 5% de probabilidade.
As barras indicam o desvio-padrão de cada tratamento.

Resultados semelhantes ao presente trabalho foram observados por Nicoloso & Erig (2002) estudando o efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente, no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Petersen (ginseng brasileiro) *in vitro*, observaram que segmentos apicais produziram menor número de brotos, mas com um maior número de nós e que segmentos basais proporcionaram maior número de brotos e plântulas com maior comprimento.

Já Sousa & Miranda (2002), estudando o efeito do tipo de explante e da relação AIB/BAP na micropropagação de *Catharanthus roseus* G. Don, obtiveram resultados diferentes para a variável número de brotos, onde o segmento apical produziu um maior número de brotos, em relação ao segmento nodal.

De acordo com PIERIK (1990) e Grattapaglia & Machado (1990), são comuns os efeitos da posição dos explantes sobre a multiplicação *in vitro*. O uso de segmentos de origem basal e apical pode causar uma fonte de variação na resposta final e, dessa forma, provocar erros na estimativa da multiplicação. Isso confirma os resultados desse trabalho e salienta a importância de se trabalhar com material vegetal homogêneo para maior precisão na estimativa do estande de plântulas a ser obtido no processo de multiplicação *in vitro*.

Experimento II: Diferentes volumes

O volume de meio influenciou significativamente as variáveis número de nós e comprimento do maior broto, sendo o efeito linear mais adequado para explicar os resultados ($p<0,05$). Já para as variáveis número de brotos, número de raízes principais e taxa de sobrevivência, nos diferentes volumes de meio, eles não tiveram influência significativa.

Para as variáveis número de nós e comprimento do maior broto observou-se que à medida que aumenta o volume do meio de cultura há um aumento das duas variáveis. (Figura 3).

Para o comprimento médio do maior broto observou-se que até o volume de 40 ml foram obtidos brotos com maior comprimento (7,57 cm) e no volume de 10 ml verificou-se plântulas com 2,54 cm, sendo o menor comprimento por broto obtido (Figura 1).

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Para o comprimento médio do maior broto observou-se que até o volume de 40 ml foram obtidos brotos com maior comprimento (7,57 cm) e no volume de 10 ml verificou-se plântulas com 2,54 cm, sendo o menor comprimento por broto obtido (Figura 1).

O maior volume de meio nos frascos pode ter promovido uma melhor disponibilidade de nutrientes para as plântulas levando a um maior comprimento e número de nós, além de apresentarem maior vigor, coloração verde e alta taxa de sobrevivência (88%) apesar de não significativo para essa variável (Figura 4). Nesse sentido um menor volume de meio pode ter agravado a competição entre plântulas, levando à redução do crescimento.

Resultados semelhantes foram observados por REIS et al. (2004), onde os autores estudaram os tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivo na multiplicação de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* Stokes), sendo testados os volumes de 10, 20, 30 e 40 ml de meio, na qual foram obtidos melhores resultados com os volumes de 30 e 40 ml.

Pereira, et al. (2006), estudando a proliferação *in vitro* de brotos de curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Sm.), utilizando diferentes volumes de meio (10, 15, 20, 25 e 30 ml) observou que houve um aumento do número de brotos de curauá à medida que se aumentava o volume de meio. Já Rodrigues et al. (2005) verificaram maior proliferação de

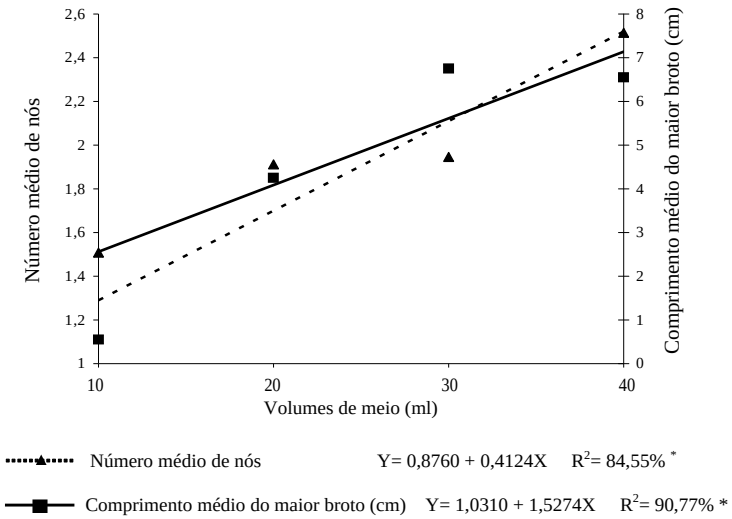

FIGURA 3 – Número médio de nós por planta e comprimento médio do maior broto de *Melissa officinalis* cultivadas em diferentes volumes de meio MS após 30 dias de cultivo.
* Significativo ao nível de 5%, pelo Teste de F.

FIGURA 4 – Volumes de meio no crescimento *in vitro*, de segmentos nodais de *Melissa officinalis*, após 30 dias de cultivo.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

brotos de *Cattleya persivaliana* (Rchb.f.) O'brien, em frascos contendo 50 ml de meio, quando comparados com aqueles de 25, 75 e 100 ml.

Assim, infere-se que o rendimento esperado do cultivo *in vitro*, em se tratando do volume de meio de cultura, será em função do programa de desenvolvimento de cada espécie vegetal.

CONCLUSÃO

O volume de meio de cultura influencia no crescimento *in vitro* de melissa, sendo que à medida que aumenta o volume de meio há tendência de aumento do número de nós e comprimento do maior broto.

A posição do segmento caulinar influencia na micropropagação de melissa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, R.; FAVARETTO, N.; PINTO, J. E. B.; DESCHAMPS, C.; INNECCO, R. Influência de fatores físicos no desenvolvimento e crescimento *in vitro* de batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Poir]. **Ciência e Prática**. Lavras, MG, v. 19, n. 2, p. 158-164, abr./jun. 1995.

CRESPO, L. E.; CASTRO, H. G.; CAMPOSTRINI, E.; LEAL, N. R.; BARRETO, G. S. Regeneração *in vitro* de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 161.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA - CNPH, 1990. p. 610-612.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1998. p. 183-260.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais.** Viçosa, MG: UFV, 1998. 220 p.

MURASHIGE, T. **Clonal crops through tissue culture**. In: BARZ, W.; REINHARD, E. & ZENCK, M. H. eds. **Plant tissue culture and its biotechnological application**, New York, Springer-Verlag, 1977. p. 392-406.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum,** Copenhagen. v. 15, p. 473-497, 1962.

NICOLOSO, F. T. & ERIG, A. C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia.** p. 1499-1506. 2002. Edição Especial.

PEREIRA, F. D.; PINTO, J. E. B. P.; RODRIGUES, H. C. A.; ROSADO, L. D. S.; BEIJO, L. A.; LAMEIRA, O. A. Proliferação *in vitro* de brotos de curauá utilizando diferentes volumes de meio de cultura. **Plant Cell Culture & Micropropagation.** v.2, n.2, p. 102-106. 2006.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores.** Madri: Mundi Prensa, 1990. 326p.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; CORRÊA, R. M. BERTOLUCCI, S. K. V.; LAMEIRA, O. A. Tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivo na multiplicação de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 28. n.3. p.703-709. 2004.

RODRIGUES, J. D.; ARAÚJO, A.G.; ASSIS, F. A. A; CAVALLARI, L.L.; PASQUAL, M. Crescimento in vitro de plântulas de orquídeas: quantidade de meio de cultura e número de explantes. In: 45CBO, 15CBFPO, 2CBCTP, 2005, Fortaleza. **Anais...** Horticultura Brasileira, v. 2, p. 616, ago. 2005. Suplemento.

SOUSA, C. M. & MIRANDA, R. M. Efeitos do tipo de explante e da relação AIB/BAP na micropropagação de *Catharanthus roseus*. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências da Vida. v. 22, n. 2, p. 217-222, 2002.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Massachusetts: Sinauer Associates, 2004. 719 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. & FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1998. p. 11-19.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

MICROPROPAGAÇÃO DE *Rudgea viburnoides* (CHAM.) BENTH., UMA PLANTA MEDICINAL

MICROPROPAGATION OF *Rudgea viburnoides* (CHAM.) BENTH., A MEDICINAL PLANT

MARVIN GERARDO OLIVAS BONILLA[1], JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO[2], ÉRIKA SOARES REIS[3], RICARDO MONTEIRO CORRÊA[4], LARISSA CORRÊA DO BOMFIM COSTA[4]

[1]Doutor, Departamento de Biologia/DBI – Universidade do Estado de Mato Grosso/Unemat – Avenida Tancredo Neves, 1095 – Cavalhada 2 – 78200-000 – Cáceres, MT – mgolivas@uol.com.br
[2]PhD – Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – jeduardo@ufla.br.
[3]Mestre em Agronomia – Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – erikasreis@yahoo.com.br
[4]Doutorandos em Agronomia – Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – ricardomonc7@yahoo.com.br; larissacbc@uesc.br

RESUMO

Objetivou-se, com este trabalho obter um protocolo de propagação *in vitro* de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., utilizando segmentos nodais. Para a indução de brotações múltiplas, foram inoculados segmentos nodais com 1,0 cm de comprimento em meio MS ou WPM, suplementados com níveis de 0,0; 8,88; 17,76 e 26,64 µM de BAP, mantidos em sala de crescimento e avaliados aos 60 dias após a inoculação. Pelos resultados obtidos, infere-se que o meio mais adequado para a indução de multibrotações foi o meio WPM, adicionado de 26,64 µM de BAP, que foi superior nas variáveis avaliadas e qualidade de brotos. O meio WPM, sem regulador de crescimento, permite obter, em média, um broto axilar maior que 1,0 cm. A indução de enraizamento dos brotos obtidos foi estudada em meio MS/2 e WPM adicionados de 0,0; 2,46; 4,92 e 9,84 µM de AIB. O meio WPM, suplementado com 2,46 µM de AIB, foi superior ao induzir um maior número de raízes.

Termos para indexação: Propagação *in vitro*, cultura de tecidos, planta medicinal.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the *in vitro* propagation of *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. using nodal segments as explants. For the induction of multiple shoots, nodal segments with 1.0 cm length were inoculated in MS or WPM media supplemented with 0.0; 8.88; 17.76 and 26.64 µM BAP, maintained in a growth room and evaluated 60 days after inoculation. The results obtained showed that WPM supplemented with 26.64 µM BAP was the most adequate medium for the induction of multiple shoots which was superior in all variables evaluated and shoot quality. The use of WPM media without growth regulator allows the obtainment, in average, a axillary's shoot length higher than 1.0 cm. Rooting induction on shoots was observed in MS/2 and WPM media supplemented with 0.0; 2.46; 4.92 and 9.84 µM IBA. WPM medium supplemented with 2.46 µM IBA was superior on inducing higher number of roots.

Index terms: *In vitro* propagation, tissue culture, medicinal plant.

INTRODUÇÃO

Rudgea viburnoides (Cham.) Benth, pertencente à família Rubiaceae, planta considerada medicinal principalmente em virtude das suas propriedades anti-reumáticas. É uma espécie nativa do cerrado que vem sofrendo com o extrativismo e com a redução do seu hábitat, em conseqüência da expansão agrícola.

Uma das alternativas para a preservação de espécies ameaçadas de extinção é a utilização da cultura de tecidos, principalmente na forma da propagação clonal *in vitro*, por meio da organogênese diretamente a partir do explante. A micropropagação tem sido usada com sucesso, não só para plantas que normalmente se reproduzem vegetativamente como também para outras espécies onde esse tipo de reprodução é difícil, possibilitando a multiplicação rápida e em período de tempo e espaço físico reduzidos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

O uso de reguladores de crescimento nas diferentes fases do processo pode ser considerado como essencial para a realização dos trabalhos. De acordo com França (2001), a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura propiciou amplo avanço das técnicas que constituem a biotecnologia atual. O uso de citocinina é muito favorável na fase de multiplicação *in vitro*, sendo o tipo e a concentração os principais fatores que influenciam no processo (SOUZA et al., 2003).

(Recebido em 29 de maio de 2007 e aprovado em 11 de fevereiro de 2008)

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Bertolucci (2000), ao estudar a micropropagação de *Tournefortia* cf *paniculata* Cham. (marmelinho), utilizou segmentos nodais e comparou os meios básico MS completo e diluído pela metade dos sais macro e micronutrientes e o meio WPM, verificando a superioridade do meio WPM. Ao estudar o meio suplementado com 0,0; 2,22; e 4,44 µM de BAP, obteve melhores resultados em termos de múltiplas brotações, com a suplementação com 4,44 µMde BAP. Observou também a formação de raízes com bom crescimento e desenvolvimento de brotações em meio WPM, sem a necessidade de utilização de reguladores de crescimento.

Lisowska & Kisokinska (2000) estudaram a propagação *in vitro* de *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae), planta lenhosa do leste da Ásia, a partir de explantes nodais e gemas apicais, bem como de calos derivados de cotilédones. Para a proliferação de brotos a partir de brotos apicais e segmentos nodais, foram utilizados meios basais de SH e WPM suplementados com BAP (2,22 a 22,2 µM) isolados ou em combinação com AIA (0,6µM). O enraizamento de brotos com, no mínimo, 5 mm de comprimento, foi obtido em meio MS sem regulador de crescimento.

Assim, como não existem estudos sobre multiplicação *in vitro* de *Rudgea viburnoides*, objetivou-se aqui estudar a propagação *in vitro* dessa espécie, por meio de segmentos nodais assepticamente obtidos de embriões zigóticos germinados *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A exsicata da espécie está depositada no herbário ESAL sob registro nº 15.300.

Foram utilizadas sementes de populações naturais do município de Itumirim, na região Sul de Minas Gerais, que foram inicialmente lavadas em água corrente por 10 minutos e desinfetadas com álcool 70%, por um minuto, e em seguida, em solução de hipoclorito de sódio a 2%, por quinze minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas em câmara de fluxo laminar por quatro vezes, em água destilada e autoclavada.

Embriões imaturos, no estágio torpedo, foram excisados na câmara de fluxo laminar horizontal e inoculados diretamente em tubos de ensaio de 25 x 150 mm. O meio utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), solidificado com ágar a 0,6% e pH ajustado em 5,7 ± 0,1, sendo os embriões cultivados em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas de luz sob intensidade luminosa de 25 µmol m^{-2} s^{-1}, à temperatura de 26 ± 1 ºC e umidade relativa do ar de 70 ± 5%.

Efeito do BAP, adicionado aos meios MS e WPM, sobre a indução de brotações múltiplas em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides*.

Segmentos nodais, com aproximadamente 10 mm de comprimento, contendo 2 gemas axilares foram inoculados verticalmente em tubos de ensaio de 25 x 150 mm. Os explantes foram cultivados em sala de crescimento em fotoperíodo de 16 horas, sob uma intensidade luminosa de 25 µmol m^{-2} s^{-1}, a uma temperatura de 26 ± 1 ºC e umidade relativa do ar de 70 ± 5%. A avaliação foi realizada aos 60 dias após a inoculação considerando-se as seguintes variáveis: comprimento de brotos (CB) peso de matéria seca de brotos (PMSB) e número total de brotações (NTB).

O experimento foi conduzido utilizando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis repetições, sendo cada repetição constituída por cinco tubos. Os tratamentos foram dispostos num esquema fatorial 4 x 2, sendo constituídos por 4 concentrações de BAP (0,0; 8,88; 17,76 e 26,64 µM), combinadas 2 meios de cultura (MS e WPM) (LLOYD & MCCOWN, 1981).

Efeito do AIB, adicionado aos meios MS/2 e WPM, sobre a indução de enraizamento em brotações de *Rudgea viburnoides*

Foram utilizados como explantes segmentos nodais com aproximadamente 10 mm de comprimento, contendo 2 gemas axilares, oriundos de plântulas cultivadas em meio WPM, isento de regulador, inoculados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm. Os explantes foram cultivados em sala de

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

crescimento em fotoperíodo de 16 horas, sob uma intensidade luminosa de 25 µmol m^{-2} s^{-1}, à uma temperatura de 26 ± 1 °C. A avaliação foi efetuada aos 60 dias após a inoculação considerando-se as seguintes variáveis: número de raízes (NR), tamanho de raiz (TR) e comprimento de brotos (CB).

Para os dados obtidos nos dois experimentos, as variáveis foram submetidas à análise de variância de acordo com modelo sugerido por STEEL et al. (1997) para os experimentos fatoriais. Quando houve efeito significativo dos tratamentos, aplicou-se o teste F para comparar os dois meios de cultura, tanto isoladamente como em cada concentração de BAP, utilizando-se a análise de regressão para avaliar o comportamento das variáveis analisadas em função das concentrações de BAP.

O segundo experimento foi conduzido utilizando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis repetições, sendo cada repetição constituída por cinco tubos. Os tratamentos foram dispostos num esquema fatorial 4 x 2, sendo constituídos por concentrações de AIB de 0; 2,46; 4,92 e 9,84 µM, combinadas com os meios de cultura MS/2 e WPM (LLOYD & MCCOWN, 1981).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do BAP, adicionado aos meios MS e WPM, sobre a indução de brotações em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides.*

Houve efeito significativo da interação entre meios de cultura e concentrações de reguladores ($p<0,05$) para o comprimento das brotações.

O meio de cultura e o regulador de crescimento influenciaram significativamente o comprimento das brotações. Assim, verificou-se a superioridade do meio WPM em todos os níveis de BAP, com relação ao tamanho de brotação (Tabela 1).

Tanto no meio MS quanto no meio WPM a presença de BAP favoreceu significativamente o comprimento das brotações, evidenciando que a presença desse fitoregulador foi importante no processo de micropropagação da espécie em estudo (Tabela 1).

Os dados alcançados nesse trabalho com relação ao tamanho de brotação nos meios básicos completos, concordam com os obtidos por Parra & Amo-Marco (1998) que, ao compararem a formulação de macronutrientes dos meios MS, MS/2, MS com metade da concentração de NH_4NO_3 e WPM, verificaram que o maior comprimento das brotações de segmentos nodais de *Myrtus communis* L. foi obtido em meio WPM.

Quanto à análise de regressão (Figura 1), verifica-se que, com o meio MS, o efeito dos níveis crescentes de BAP foi linear sobre o tamanho de brotações, ao passo que, dentro do meio WPM, o efeito foi do tipo senoidal. No presente trabalho, o maior tamanho de brotos foi obtido em meio WPM, suplementado com 26,64 µM de BAP. Em *Echinodorus cf. scaber* Rataj, o número de brotações e folhas aumentou com níveis de BAP, porém o tamanho de

TABELA 1 – Valores médios para o comprimento de brotações (cm) de *Rudgea viburnoides*, em função de meios de cultura e níveis de BAP[1].

	BAP (µM)			
Meios	**0,0**	**8,88**	**17,76**	**26,64**
MS	1,47 bB	2,00 bA	1,95 bA	2,38 bA
WPM	2,21 aC	3,78 aA	3,01 aB	3,95 aA

[1]Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

brotações e de raízes diminuiu, sendo que o tratamento mais eficiente foi com 1,0 mg L^{-1} de BAP.

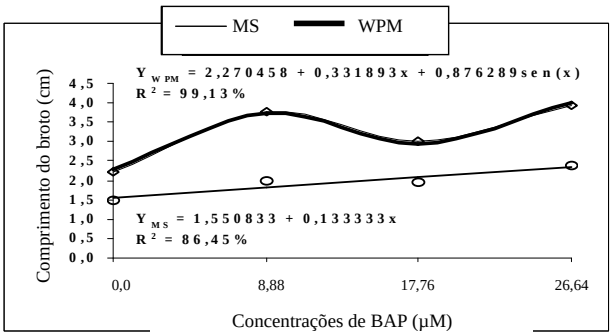

FIGURA 1 – Comprimento de brotação de *Rudgea viburnoides* em meio MS e WPM, em função das concentrações de BAP.

Com relação à variável peso de matéria seca de brotos, verificou-se que os efeitos do meio e do regulador foram significativos, sendo que o meio básico WPM proporcionou resultado maior do que o meio MS, contrastando com os resultados observados por Bertulucci (2000), que não observou diferença no peso de matéria seca de brotações ao comparar os meios MS, MS/2 e WPM, aos 45 dias (Tabela 2).

Verificou-se que os níveis crescentes de BAP tiveram um efeito linear positivo sobre peso de matéria seca de brotos (Figura 2), permitindo-se inferir que se espera um aumento médio de 0,0060 g, para cada incremento de uma unidade que se aumentar na concentração de BAP.

Forni & Pasqual (1996) também verificaram o efeito linear do BAP sobre o peso de matéria seca de parte aérea de café, nas concentrações de 0,0 a 39,96 µM. Nesse estudo, a concentração de BAP mais eficiente para essas variáveis foi a de 26,64 µM.

Para a variável número total de brotações, verificou-se a superioridade do meio WPM, com aproximadamente 52% mais brotos do que o meio MS (3,62 brotos contra 2,39). Resultados semelhantes foram obtidos por COELHO (1999) com sucupira-branca, que também, verificou a superioridade do meio WPM (Tabela 2).

Verifica-se que os níveis crescentes de BAP tiveram um efeito quadrático significativo sobre os brotos totais < 1,0 cm (Figura 3) e um efeito não-significativo para o número

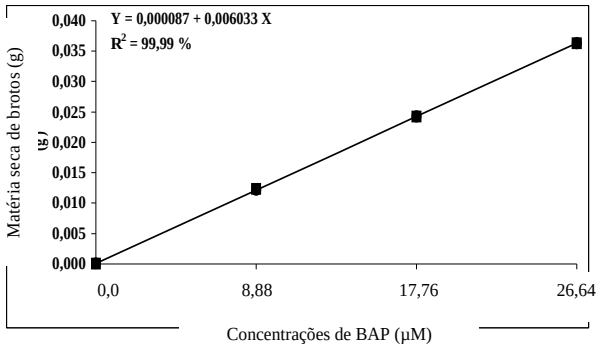

FIGURA 2 – Efeito de níveis crescentes de BAP sobre a matéria seca de brotos em *Rudgea viburnoides*.

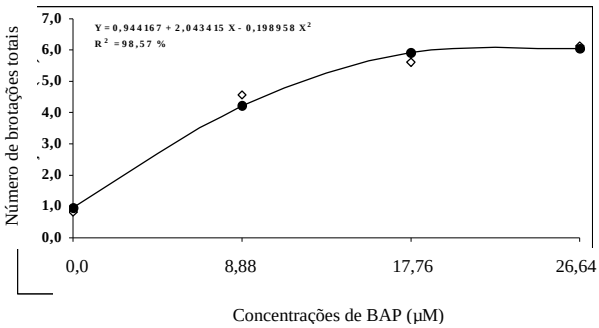

FIGURA 3 – Efeito da concentração de BAP sobre o número de brotações totais < 1,0 cm em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides*.

TABELA 2 – Valores médios de peso de matéria seca de brotos (PMSB) e número total de brotações (NTB) em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetidos aos diferentes meios de cultura[1].

Meios básicos	PMSB (g)	NTB
MS	0,014 b	2,39 b
WPM	0,023 a	3,62 a

[1]Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

de brotos totais > 1,0 cm. O número máximo de brotos < 1,0 cm (6,22 brotos) foi obtido na dose de 26,64 µM de BAP; portanto, a proliferação de brotos foi proporcional à concentração de BAP utilizada.

Efeito do AIB, adicionado aos meios MS/2 e WPM, sobre a indução de enraizamento de brotações de *Rudgea viburnoides*.

Observou-se que houve não efeito significativo da interação meios de cultivo e níveis de AIB, no número de raízes ($p<0,05$).

Os resultados médios de número de raízes indicam que houve diferença significativa entre os meios e que o meio WPM superou o meio MS/2, nos tratamentos sem regulador e com 2,46 µM de AIB (Tabela 3).

Constatou-se que as concentrações de AIB utilizadas não influenciaram no número de raízes, evidenciando que, possivelmente, seriam necessárias maiores concentrações desse regulador para o enraizamento (Tabela 3).

Quanto à ocorrência de enraizamento em meio WPM, sem regulador, há concordância com o relato de Bertolucci (2000), que obteve enraizamento de *Tournefortia* cf *paniculata* em meio WPM, e discorda com o verificado por SANTOS (2001), que só obteve enraizamento de *Salix humboldtiana* Willd. em meio WPM, com regulador (AIB) e carvão ativado.

O AIB na dose de 2,46 µM induziu à formação do maior número de raízes e com maior freqüência de indução de enraizamento (65,2%) no meio WPM (2,18 contra 0,45 raiz/explante no meio MS/2). Maiores concentrações passaram a ter um efeito inibitório sobre essa variável.

O número de raízes no meio MS/2 tendeu a aumentar ao se elevar os níveis de AIB, embora esse efeito não tenha sido significativo. No meio WPM, o maior número de raízes foi obtido com AIB na concentração de 2,46 µM. A partir dessa concentração, houve um decréscimo do número de raízes até a dose de 9,84 µM (Tabela 3). SANTOS (2001) verificou efeito inibitório do AIB, somente em concentrações acima de 14,76 µM, ao trabalhar com *Salix humboldtiana* em meio WPM, enquanto CARVALHO et al. (2005) verificaram aumento no número de raízes por explante ao adicionar-se AIB sob concentrações maiores ao meio de cultivo.

Com relação à variável tamanho de raiz verificou-se que os meios e os níveis de AIB não afetaram essa variável, contudo as médias do meio WPM foram ligeiramente maiores (0,69 cm contra 0,51cm no meio MS). De acordo com Grattapaglia & Machado (1990), durante a fase de enraizamento *in vitro*, uma toxidez de auxina pela alta concentração ou pelo longo período de exposição dos brotos ao meio indutor, poderia se manifestar somente na fase de alongamento das raízes, em que elas não continuariam seu crescimento.

Para a variável tamanho de broto, observou-se que para os dois meios, houve diferença significativa na ausência de regulador, sendo o meio WPM superior ao meio MS/2 (2,41 contra 1,56 cm). Com relação às doses de AIB, conclui-se que os níveis crescentes do regulador tiveram comportamento diferenciado sobre o tamanho de broto, nos dois meios. No meio MS/2, essas concentrações tiveram um efeito linear ligeiramente positivo, mas não

TABELA 3 – Médias da interação Meio x AIB, para número de raízes (NR) em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides*, submetidos a vários níveis de AIB[1].

	AIB (µM)			
Meios	**0,0**	**2,46**	**4,92**	**9,84**
MS/2	(21,4)[2] 0,41bA	(23,0) 0,45 bA	(51,8) 0,85 aA	(38,5) 1,04 aA
WPM	(48,0) 1,81 aA	(65,2) 2,18 aA	(38,5) 1,07 aA	(40,7) 1,04 aBA

[1]Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
[2]Números entre parênteses referem-se à porcentagem de indução de enraizamento.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

significativo. No meio WPM (Figura 4), essas mesmas doses tiveram um efeito linear negativo e o tamanho de brotação teve uma redução, conforme o incremento dos níveis de AIB. De acordo com Pereira et al. (2000), o menor crescimento da parte aérea é uma resposta típica dos explantes cultivados em meio suplementado com AIB.

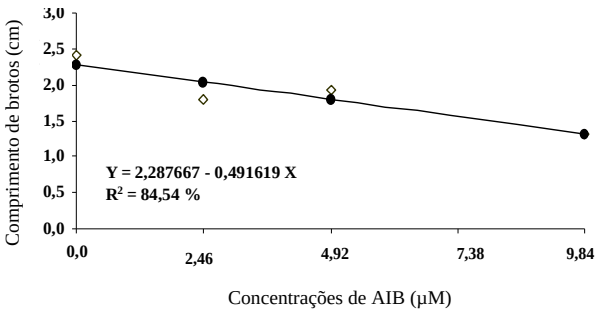

FIGURA 4 – Efeito da concentração de AIB sobre o comprimento de brotos de *Rudgea viburnoides*, em meio WPM.

CONCLUSÕES

O meio WPM proporciona um maior tamanho de brotações e número de brotos, em relação ao meio MS.

A presença de BAP, sob vários níveis, tanto no meio MS quanto no meio WPM, proporciona maior matéria seca e número de brotos.

A concentração de 26,64 µM de AIB em meio WPM proporciona o maior número e tamanho de brotos, em relação ao meio MS.

O maior número de raízes é obtido em meio WPM suplementado com 2,46 µM de AIB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTOLUCCI, S. K. V. **Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica *in vivo* e *in vitro* de *Tournefortia* cf *paniculata* Cham.** 2000. 79p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

CARVALHO, J.F.R.P.; CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. Regeneração *in vitro* de urucum (*Bixa orelana* L.) a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29 n. 6, p. 887-895, 2005.

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

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCAR, 2000. p.255-258.

FORNI, R. C.; PASQUAL, M. Influência da citocinina, BAP e concentrações dos componentes do meio "MS" na micropropagação do café "catuaí". **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.20, n.4, p. 468-474, 1996.

FRANÇA, S. C. de. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 3. ed. rev. Porto Alegre; Florianópolis: UFRGS; UFSC, 2001. p. 105-124.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 99-170.

LISOWSKA, K; WYSOKINSKA, H. *In vitro* propagation of *Catalpa ovata* G. Don. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.60, p.171-176, 2000.

LLOYD, G.; MC COWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators' Society Combined Proceedings of Annual Meeting**, Washinton, v.30, p.421-427, 1981.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

PARRA, R.; AMO-MARCO, B. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation of *Myrtus communis* L.: a comparison of adult and seedling material. ***In Vitro* Cellular and Developmental Biology. Plant**, Columbia, v.34, p.104-107, 1998.

PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.W.; MORAES, R.M.; FRANÇA, S.C. Micropropagation of *Salix humboldtiana* Hild. **Revista Brasileira Plantas Médicinais**, Botucatu, v.2, n.2, p.17-21, 2000.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

SANTOS, B. R. **Propagação *in vitro* e abordagem fitoquímica em salix (*Salix humboldtiana* Willd).** 89p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2001.

SOUZA, A. V.; PINTO, J. E. B. P; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORRÊA, R.M.; CASTRO, E.M. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, p. 1532-1538, 2003. Edição Especial.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. **Principle and procedure of statistics: a biomedical approach**. 3.ed. Boston: Mc Graw-Hill, 1997. 666p.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE E QUALIDADE DE LUZ NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS DE ORQUÍDEA

EFFECT OF SUCROSE CONCENTRATION AND LIGHT QUALITY ON THE *IN VITRO* PROPAGATION OF ORCHID PLANTLETS

APARECIDA GOMES DE ARAUJO[1], MOACIR PASQUAL[2], EVARISTO MAURO DE CASTRO[3], FILIPE ALMENDAGNA RODRIGUES[4], DALILHIA NAZARÉ DOS SANTOS[4], LEONARDO FERREIRA DUTRA[5]

[1]Pós-Doutoranda em Agronomia – Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras,/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – agaraujo2003@yahoo.com.br
[2]Doutor, Professor – Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras,/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – mpasqual@ufla.br
[3]Doutor, Professor – Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – emcastro@ufla.br
[4]Graduandos em Agronomia – Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – filipealmendagna@yahoo.com.br
[5]Pesquisador – Embrapa Florestas/CNPF – Cx. P. 319 – 83411-000 – Colombo, PR – leo@cnpf.embrapa.br

RESUMO

O cultivo *in vitro*, sob condições adequadas de luz e de concentração de sacarose, pode influenciar no crescimento dos explantes, fazendo com que o processo de micropropagação seja mais econômico e se obtenham mudas de melhor qualidade. Objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar diferentes qualidades de luz e concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura Wood Plant Médium (WPM), na micropropagação de *Cattleya loddigesii* Lndl.'Tipo', possibilitando uma otimização no processo de produção *in vitro*. Plântulas oriundas de sementes produzidas por autofecundação e germinadas *in vitro*, com 1,0 cm de comprimento e contendo raízes foram inoculadas em frascos contendo 60 mL de meio WPM acrescido de concentrações de sacarose (0, 20, 40 e 60 g L^{-1}) e adicionados de carvão ativado (2 g L^{-1}), solidificado com ágar (6 g L^{-1}) e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121ºC e 1,5 atm, por 20 minutos. Os frascos (5 plântulas/frasco) foram mantidos em diferentes ambientes de cultivo (CV: casa de vegetação; CVA: casa de vegetação com sombrite azul; CVV: casa de vegetação com sombrite vermelho; SC: sala de crescimento; SCA: sala de crescimento com sombrite azul; SCV: sala de crescimento com sombrite vermelho). Decorridos 90 dias, verificou-se o melhor crescimento *in vitro* em meio WPM com 15 g L^{-1} de sacarose e cultivo em sala de crescimento convencional. Maior enraizamento e massa seca de plântulas foram verificados em meio com 45 g L^{-1} de sacarose, independente do ambiente de cultivo. Para crescimento de raízes recomenda-se cultivo sob sombrite vermelho, em sala de crescimento.

Termos para indexação: *Cattleya*, micropropagação, Orchidaceae.

ABSTRACT

In vitro culture under adequate conditions of light and sucrose concentration may influence explant growth, which results in a more economic micropropagation process with the production of high quality plants. The objective of this work was to evaluate the different light quality and sucrose concentrations supplemented to the WPM medium on the micropropagation of *Cattleya loddigesii* 'Tipo' in order to optimize its *in vitro* propagation. Seedlings obtained from seeds produced through self pollination and germinated *in vitro*, showing 1.0 cm length and roots were inoculated in flasks containing 60 mL WPM medium supplemented with different concentrations (0, 20, 40 and 60 gL^{-1}) of sucrose, 2 gL^{-1} activated charcoal, 6 gL^{-1} agar and pH adjusted to 5.8 prior autoclaving at 121º C during 20 minutes. The flasks (containing 5 seedlings) were maintained on the following culture environments: greenhouse (CV); greenhouse with a blue shading net (CVA); greenhouse with a red shading net (CVV), growth room (SC); growth room with a blue shading net (SCA) and growth room with a red shading net (SCV). After 90 days, it was observed that the best *in vitro* development was obtained on WPM medium supplemented with 15 gL^{-1} sucrose under the environment of a normal growth room (SC). Higher rooting and seedling dry matter were observed in medium supplemented with 45 gL^{-1} sucrose, regardless of the culture environment. For root growth it is recommended seedling cultivation on a growth room under a red shading net.

Index terms: *Cattleya*, micropropagation, Orchidaceae.

INTRODUÇÃO

Poucos estudos têm sido realizados buscando compreender o efeito da qualidade de luz no crescimento e no desenvolvimento dos tecidos de plantas cultivadas *in vitro*. Entretanto, esses estudos têm demonstrado que a qualidade da luz pode alterar a concentração de carboidrato e hormônios dentro da planta (ALMEIDA & MUNDSTOCK, 2001; ERIG & SCHUCH, 2005).

(Recebido em 13 de abril de 2007 e aprovado em 10 de março de 2008)

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

A qualidade da luz utilizada nas salas de crescimento é de suma importância na morfogênese *in vitro*. Dignart (2006), testando o efeito de sombrites coloridos (vermelho e azul) sobre frascos contendo plântulas de *Cattleya walkeriana* Gardner cultivados em casa de vegetação (CV) e sala de crescimento (SC), verificou que CV com sombrite azul resultou em maior número de brotos.

O excesso de sacarose pode ser prejudicial, pois inibe a síntese de clorofila e, portanto, reduz a capacidade fotossintética das culturas, mesmo sendo essencial ao crescimento (YAMADA & SATO, 1978). Foi observado aumento na taxa de fotossíntese, em subculturas sucessivas, quando a concentração de sacarose foi reduzida de 20 ou 40 g L^{-1} para 10 g L^{-1} (PASQUAL, 2001). Embora o açúcar não seja o componente de maior custo no preparo do meio de cultura, a redução da sua concentração pode ser economicamente favorável, especialmente por causa da a uma menor propensão de crescimento de fungos e bactérias (PRAKASH et al., 2004).

Dignart (2006) obteve resultados similares para número de folhas, número de brotações e comprimento de parte aérea, em *Cattleya walkeriana* Lndl., testando as concentrações de 15 e 30 g L^{-1} de sacarose. Faria et al. (2004), estudando o crescimento e enraizamento *in vitro* de plântulas de *Dendrobium nobile*, sob diversas concentrações de sacarose no meio MS com metade da concentração de macronutrientes, verificaram maior crescimento em altura (4,21±0,91 cm) e altas taxas de multiplicação (1:4), com 60 g L^{-1} de sacarose.

Com o objetivo de otimizar o processo de micropropagação de *Cattleya loddigesii* Lndl. 'Tipo' avaliaram-se diferentes qualidades de luz e concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura WPM.

MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* 'Tipo', oriundas de sementes produzidas por autofecundação e germinadas *in vitro*, com aproximadamente 1,0 cm de comprimento e com raízes, foram inoculadas em frascos de vidro (5 plântulas/frasco) com capacidade para 250 cm^3, contendo 60 mL de meio WPM-Wood Plant Medium (LLOYD & McCOWN, 1980), acrescido de sacarose (0, 20, 40 e 60 g L^{-1}), carvão ativado (2 g L^{-1}), ágar (6 g L^{-1}) e pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem, a 121ºC e 1,5 atm, por 20 minutos.

Após um ensaio prévio, determinou-se o melhor meio para essa espécie como sendo o WPM. Após a inoculação, os frascos foram vedados com tampas plásticas translúcidas e filme plástico e, em seguida, transferidos para diferentes condições de incubação (CV: casa de vegetação; CVA: casa de vegetação sob sombrite de malha azul; CVV: casa de vegetação com sombrite de malha vermelha; SC: sala de crescimento; SCA: sala de crescimento com sombrite de malha azul; SCV: sala de crescimento com sombrite de malha vermelha).

O material foi colocado diretamente sobre as bancadas em casa de vegetação com temperatura média de 29,8 C e sob malhas fotoconversoras. As malhas coloridas utilizadas foram fornecidas pela empresa Polysac Plastic Industries®. Utilizou-se a malha ChromatiNet Vermelha 50%, que reduz ondas azuis, verdes e amarelas e acrescenta ondas na faixa espectral do vermelho e vermelho-distante. Outro tratamento foi com a malha ChromatiNet Azul 50%, que reduz ondas na faixa do vermelho e vermelho distante e acrescenta ondas azuis.

Foram cultivadas também plântulas em frascos mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 25±2ºC e radiação de 5,52 W m^{-2} s^{-1} (LI-200SA; Li-cor, Lincoln, Nevasca, USA), para servirem como tratamento controle. Em sala de crescimento, foram testadas também as coberturas coloridas CromatiNet vermelha e azul.

A intensidade da radiação (Tabela 1) foi mensurada por meio de sensores de radiação, acoplados a um sistema de registro (LI 1400; Licor. Neb).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x6, com cinco repetições e cada repetição constituída de 5 plântulas. Os dados foram comparados pelo programa Sisvar (Ferreira, 2000). O experimento foi avaliado após 90 dias da instalação, considerando-se: número de folhas e número de brotos por explante, comprimento de parte aérea (cm), número de raízes por explante, comprimento de raízes (cm) e massa seca total de plântulas (g).

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

TABELA 1 – Radiação média (W m^{-2} s^{-1}) observada nos microambientes em casa de vegetação e sala de crescimento.

Ambiente	Radiação	Ambiente	Radiação
CV	13,07	SC	5,52
CVV	9,60	SCV	5,40
CVA	13,07	SCA	6,68

CV:casa de vegetação; CVV:casa de vegetação com sombrite vermelho; CVA:casa de vegetação com sombrite azul; SC:sala de crescimento; SCV:sala de crescimento com sombrite vermelho e SCA:sala de crescimento com sombrite azul.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa da concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura e as diferentes qualidades de luz, para as características comprimento de parte aérea e comprimento de raízes. O número de folhas e de brotos apresentaram significância para ambos os fatores estudados. Para número de raízes e massa seca de plântulas houve efeito significativo apenas entre os níveis de sacarose.

Analisando-se a Figura 1A, após derivação da equação, verifica-se que houve melhores respostas (7,97) para número de folhas, quando foram utilizados 15 g L^{-1} de sacarose. Na ausência de sacarose, observaram-se 7,77 folhas por explante. Porém, a omissão total da sacarose no meio não é recomendada, pois não há fornecimento de outra fonte de carboidrato para os explantes.

O cultivo em sala de crescimento (SC) e o realizado em sala de crescimento com sombrite vermelho (SCV) proporcionaram melhores resultados para essa variável, apresentando 8,74 e 8,31 folhas, respectivamente. O uso de sombrite azul em SC promoveu resultados inferiores, porém semelhantes àqueles observados em casa de vegetação com e sem sombrites coloridos (Tabela 2).

De modo geral, a luz azul impede o alongamento do pecíolo, porém aumenta a área da lâmina foliar. Resultados semelhantes foram obtidos por Dignart (2006), em *Cattleya walkeriana*. Esse autor (2006) observou que o número de folhas em sala de crescimento foi maior que em casa de vegetação e que as malhas coloridas não resultaram em diferenças significativas para essa variável.

Melhores resultados para o número de brotos (2,04) foram obtidos com a adição de 15 g L^{-1} de sacarose (Figura 1B).

O cultivo em sala de crescimento, independente da utilização de malhas coloridas, proporcionou maior número de brotos (Tabela 2). Esses resultados concordam com aqueles observados por Dignart (2006), para *Cattleya walkeriana*.

Dignart (2006), não observou diferenças significativas entre as concentração de sacarose adicionada ao meio para número de brotos em *C. walkeriana*, contudo, quando esse carboidrato foi omitido do meio, a brotação foi prejudicada.

O maior comprimento da parte aérea (3,0 cm) foi verificado com, aproximadamente, 15 g L^{-1} de sacarose (Figura 2) e cultivo sob condições de sala de crescimento (SC). O cultivo em sala de crescimento sob malha vermelha (SCV) também foi significativo (2,25 cm), combinado com 27 g L^{-1} de sacarose, mas com resultados inferiores ao cultivo em sala de crescimento (SC). De modo geral, comprimentos de onda mais longos, principalmente na luz vermelha, promovem acentuado alongamento nas células, enquanto que as luzes azul e branca previnem o alongamento.

Dignart (2006), registrou os mesmos resultados, trabalhando com orquídea *Cattleya walkeriana*, constatando que 15 g L^{-1} de sacarose foi a concentração que resultou no maior comprimento de parte aérea. Fráguas et al. (2004) reportaram que um meio de cultura contendo 20 g L^{-1} de sacarose foi eficiente no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya labiata* x *Laelia itambana*. Ao contrário, Oliveira et al. (2003) obtiveram melhores respostas para altura de parte aérea em plântulas de *Oncidium varicosum* Lndl., com a utilização de 60 g L^{-1} de sacarose.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

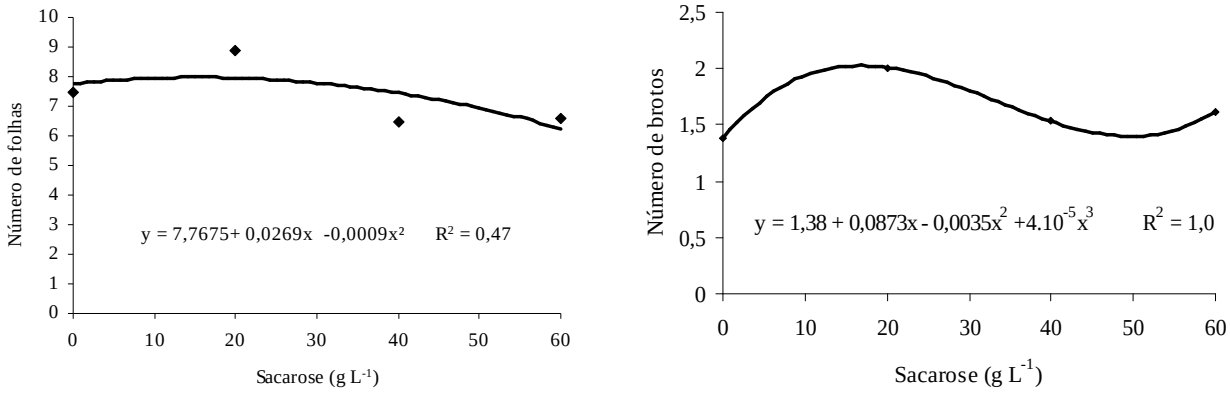

FIGURA 1 – A) Número de folhas e B) Número de brotos em plântulas de *C. loddigesii* cultivadas em meio WPM, com diferentes concentrações de sacarose.

TABELA 2 – Número de folhas (NF) e de brotos (NB) em plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo' cultivadas em meio WPM, sob diferentes qualidades de luz.

Tratamento	NF	NB
Casa de vegetação (CV)	6,72 b	1,54 b
Casa de vegetação com sombrite azul (CVA)	6,61 b	1,33 b
Casa de vegetação com sombrite vermelho (CVV)	6,91 b	1,57 b
Sala de crescimento (SC)	8,74 a	1,90 a
Sala de crescimento com sombrite azul (SCA)	7,09 b	1,67 a
Sala de crescimento com sombrite vermelho (SCV)	8,31 a	1,81 a

*Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

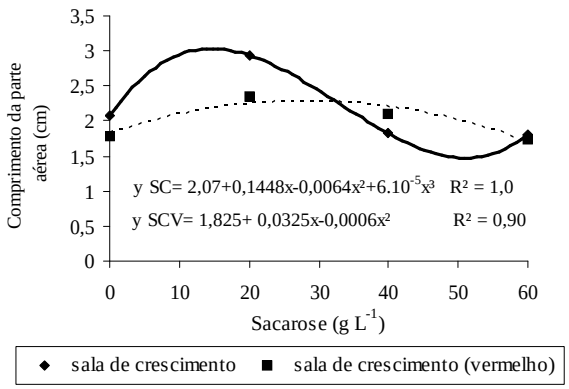

FIGURA 2 – Comprimento da parte aérea em plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas em meio WPM e mantidas sob diferentes ambientes e concentrações de sacarose.

Para a condição de incubação, os resultados diferem daqueles encontrados por Dignart (2006), que obteve maior comprimento de parte aérea no cultivo de *Cattleya walkeriana*, em sala de crescimento, sob telas azul e vermelha (2,65 e 2,45, respectivamente).

Radman et al. (2001) constataram maior taxa de crescimento de *Gypsophila* no tratamento com menor intensidade luminosa e explicam que o maior crescimento dos brotos pode ser resultado do processo de estiolamento induzido pela luminosidade deficiente nas salas de crescimento, ocasionando maior crescimento dos entrenós com caules mais finos.

Maior número de raízes (2,87 raízes) foi registrado com a adição de 45 g L^{-1} de sacarose ao meio de cultura (Figura 3).

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

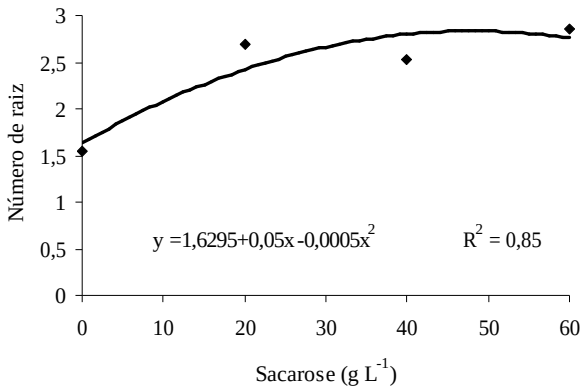

FIGURA 3 – Número de raízes em plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas em meio WPM, com diferentes concentrações de sacarose.

Os resultados obtidos mostram que o desenvolvimento radicular dessa espécie está diretamente relacionado à concentração de sacarose no meio de cultura e estão de acordo com os encontrados por Chong & Pua (1985) e Shibli et al. (1992), que observaram a necessidade de fornecimento de alta concentração de sacarose para a emissão de raízes em várias espécies.

Resultados similares foram obtidos por Dignart (2006), que também observou que o número de raízes foi menor para as menores concentrações de sacarose no meio de cultivo *in vitro* de orquídeas (*Cattleya*), porém, a sacarose não influenciou no comprimento das mesmas. Oliveira et al. (2003) registraram melhores respostas para número de raízes em plântulas de *Oncidium varicosum*, com a utilização de 60 g L^{-1} de sacarose.

No presente trabalho, o fator qualidade de luz não teve influência sobre o número de raízes. Dignart (2006) observou respostas similares em todos os tratamentos, exceto sala de crescimento sob sombrite azul, com média inferior (2,71 raízes) no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*.

Para o comprimento de raízes, melhores resultados (2,52 cm) foram obtidos com a utilização de 45 g L^{-1} de sacarose e cultivo sob sala de crescimento com malha vermelha, seguido do cultivo em sala de crescimento com 60 g L^{-1} de sacarose, com 2,43 cm de comprimento (Figura 4). Os demais tratamentos proporcionaram respostas inferiores.

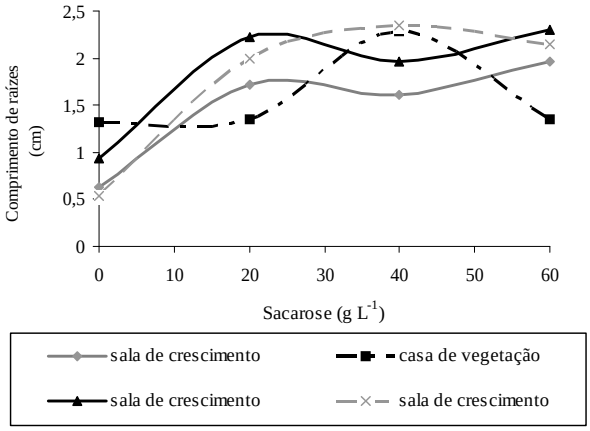

FIGURA 4 – Comprimento de raízes em plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas em meio WPM, sob diferentes qualidades de luz e concentrações de sacarose.

Esses resultados foram contrários aos observados por Dignart (2006), que não verificou diferenças significativas entre os tratamentos de qualidade de luz para essa variável e também registrou que a sacarose não influenciou o comprimento das raízes. Faria et al. (2004) observaram que o acréscimo de sacarose no meio de cultura não influenciou o enraizamento *in vitro*, em *Dendrobium nobile*.

Melhor crescimento do sistema radicular de plântulas de *Bletilla striata* Rchb. f. (Orchidaceae) foi obtido com 30 g L^{-1} de sacarose no meio de cultura (CHO & AHN, 2000). Os mesmos autores também verificaram que não houve desenvolvimento do sistema radicular na ausência de sacarose, evidenciando a essencialidade dessa fonte de carbono no meio de cultura para orquídeas. Oliveira et al. (2003) registraram melhores respostas para comprimento da maior raiz em plântulas de *Oncidium varicosum*, com a utilização de 60 g L^{-1} de sacarose.

Segundo Dignart (2006), plântulas de orquídeas são, por sua própria constituição, de fácil enraizamento, não necessitando de uma fase específica na

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

micropropagação, como ocorre para a maioria das espécies cultivadas por meio dessa técnica.

A maior massa seca de plântulas (0,034 g) foi obtida com a adição de 45 g L^{-1} de sacarose no meio de cultura WPM (Figura 5).

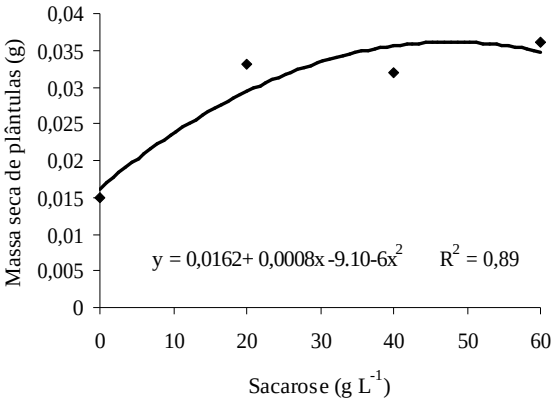

FIGURA 5 – Massa seca de plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas em meio WPM, com diferentes concentrações de sacarose.

A redução de sacarose tem sido testada em diversas pesquisas como forma de melhorar a capacidade fotossintética dos tecidos cultivados *in vitro* e reduzir perdas atribuídas à contaminação microbiana. No entanto, diversos autores são contrários à idéia de redução de sacarose durante a micropropagação e afirmam que os mecanismos pelos quais a concentração de carboidrato influencia na aclimatização não são muito claros. Portanto, manter os níveis de sacarose em torno de 2%-3% na fase que antecede a aclimatização é recomendável, pois, desse modo, a planta acumularia reservas de energia para sobreviver melhor ao ambiente (CAPELLADES et al., 1990; WAINWRIGHT & SCRACE, 1989).

Neste trabalho, melhores resultados para parte aérea de plântulas (número de folhas, número de brotos e comprimento de parte aérea) foram obtidos em sala de crescimento, com a utilização de 15 g L^{-1} de sacarose. O sistema radicular e a massa seca de plântulas foram mais responsivos em meio com 45 g L^{-1} de sacarose, e o cultivo em SCV proporciona maior comprimento de raízes.

CONCLUSÕES

Melhor crescimento *in vitro*, em plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo', são obtidos com a utilização de 15 g L^{-1} de sacarose e cultivo em sala de crescimento convencional. Maiores enraizamento e massa seca de plântulas são obtidos com a adição de 45 g L^{-1} de sacarose no meio, independente do ambiente de cultivo. Para o crescimento de raízes recomenda-se cultivo sob sombrite vermelho, em sala de crescimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. L.; MUNDSTOCK, C. M. O afilhamento da aveia afetado pela qualidade de luz em plantas sob competição. **Ciência Rural,** Santa Maria, RS. v. 31, n. 3, p. 393-400, maio/jun. 2001.

CAPELLADES, M.; FOUNTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment Influences Anatomy of Stomata and Epidermal Cells in tissue cultured *Rosa multiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science,** Alexandria, v. 115, n. 1, p. 141-145, Jan. 1990.

CHO, K. H.; AHN, Y. H. Effect of sucrose and supplementary substances on the germination ecology and the seedling growth of native *Bletilla striata*. **Korean Journal of Enviroment and Ecology,** Sowon, v. 14, p. 205-211, 2000.

CHONG, C.; PUA, E. C. Carbon nutrition of Ottawa three apple rootstocks during stages of *in vitro* propagation. **Journal of Horticultural Science,** Kent, v. 60, n. 3, p. 285-290, July 1985.

DIGNART, S. L. **Luz e sacarose na micropropagação de *Cattleya walkeriana*: alterações anatômicas e fisiológicas.** 2006. 132 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ERIG, A. C.; SCHUCH M. W. Tipo de luz na micropropagação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 27, n. 3, p. 488-490, dez. 2005.

FARIA, R. T.; RODRIGUES, F. N.; OLIVEIRA, L. V. R.; MÜLLER, C. *In vitro Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 780-783, dez. 2004.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais..** São Carlos: UFSCAR, p. 225-258. 2000.

FRÁGUAS, C. B.; VILLA, F.; SOUZA, A. V, PASQUAL, M.; DUTRA, L. F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* x *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 50, n. 292, p. 719-726, nov./dez. 2004.

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

OLIVEIRA, L. V. R.; FARIA, R. T.; FONSECA, I. C. B; SACONATO, C. Influência da fonte e concentração de carboidratos no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias,** Londrina, v. 24, n. 2, p. 265-272, 2003.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais:** fundamentos básicos. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 197 p.

PRAKASH, S.; HOQUE, M. I.; BRINKS, T. Culture media and containers. In: **Low costs options for tissue culture technology in developing countries.** Austria: IAEA – International Atomic Energy Agency, 2004. p. 29-40.

RADMANN, E. B.; BRAGA, E. J. B.; KARAN, M. A. L.; POSADA, M. A. C.; PETERS, J. A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociência,** Pelotas, v. 7, n. 3, p. 171-175, jul./set. 2001.

SHIBLI, R. A.; SMITH, M. A. L.; SPOMER, L. A. Osmotic adjustment and growth responses of three *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cultivars to osmotic stress induced *in vitro*. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 15, n. 9, p. 1373-1381, 1992.

WAINWRIGHT, H.; SCRACE, J. Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on *in vitro* establishment. **Scientia Horticulturae,** Amsterdam, v. 38, n. 3/4, p. 261-267, Mar. 1989.

YAMADA,Y.; SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 19, n. 4, p. 691-699, 1978.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

EFEITO DE CITOCININAS NA ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE FOLHAS E PECÍOLOS DE FRAMBOESEIRA (*RUBUS IDAEUS* L.) CV. BATUM

EFFECT OF CYTOKININS ON *IN VITRO* ORGANOGENESIS OF LEAFS AND PETIOLE OF RASPBERRY (*RUBUS IDAEUS* L.) CV. BATUM

LORENA PASTORINI DONINI[1], JOSEANE ALMEIDA DE SOUZA[2], LUCIANE COUTO DA SILVA[3], MARIA GORETI SENNA CORRÊA[4], MÁRCIA WULFF SCHUCH[5]

[1]Doutoranda Agronomia/Fruticultura de Clima Temperado, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – Universidade Federal de Pelotas/UFPel – Cx. P. 354 – 96010-900 – Pelotas, RS. – lorenadonini@yahoo.com.br
[2]Doutoranda Agronomia/Fruticultura de Clima Temperado, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – Universidade Federal de Pelotas/UFPel – Cx. P. 354 – 96010-900 – Pelotas, RS – joseas@ufpel.tche.br
[3]Mestranda Agronomia/Fruticultura de Clima Temperado, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – Universidade Federal de Pelotas/UFPel – Cx. P. 354 – 96010-900 – Pelotas, RS.
[4]Doutoranda Agronomia/Produção Vegetal Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – Universidade Federal de Pelotas/UFPel – Cx. P. 354 – 96010-900 – Pelotas, RS – goretisennabr@yahoo.com.br
[5]Doutora, Professora do Departamento de Fitotecnia – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – Universidade Federal de Pelotas/UFPel – Cx. P. 354 – 96010-900 – Pelotas ,RS – marciaws@ufpel.tche.br

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho determinar o tipo de explante e o tipo e a concentração de citocinina que favoreça a organogênese *in vitro*, de framboeseira *Rubus idaeus* L. cv. Batum. O meio utilizado foi MS, acrescido de 5,4µM de ANA, variando as concentrações das citocininas TDZ e 2iP. Os explantes utilizados foram folhas jovens e pecíolo, esses incubados em frascos contendo 30mL de meio. Após a inoculação, os explantes foram submetidos ao escuro, sob temperatura de 25 ± 2ºC durante 7 dias, sendo posteriormente transferidos para condições normais de sala de crescimento. A avaliação foi realizada aos 75 dias, quanto ao número de brotações/explante, porcentagem de calos e porcentagem de explantes regenerados. Os resultados permitem concluir que o tipo de explante utilizado não teve influência significativa para a organogênese *in vitro* de framboesa cv. Batum e que TDZ é a citocinina mais eficiente na indução do maior número médio de brotações e maior porcentagem de explantes regenerados.

Termos para indexação: tipos de explantes**,** regeneração de brotos, cultura de tecidos.

ABSTRACT

The objective for this research was to determine the ideal explant, type and concentration of cytokinin that promotes *in vitro* organogenesis of raspberry var. Batum. The culture medium used was MS, supplemented with 5.4µM NAA in combination with different concentrations of the cytokinins TDZ and 2iP. Young leaves and petiole inoculated in flasks containing 30mL of medium were used as explants. After the inoculation, the explants were maintained in the dark under temperature of 25±2º C for 7 days and then transferred to normal conditions of the growth room. Number of shoots/explant, percentage of callus and percentage of explant regeneration were evaluated with 75 days of cultivation. The results show that the type of explant had no significant influence on the *in vitro* organogenesis of raspberry cv. Batum, and that TDZ is the most efficient cytokinin for the induction of higher shoot average number and higher percentage of regenerated explants.

Index terms: types of explant**,** shoot regeneration, tissue culture.

A framboeseira (*Rubus idaeus* L.), originária do centro e norte da Europa e de parte da Ásia, pertence à família Rosaceae e ao gênero *Rubus*, sendo rica em nutrientes como antocianinas, aminoácidos e vitaminas. Encontra-se no grupo de pequenas frutas que vêm despertando a atenção dos pesquisadores, comerciantes e produtores, em razão do grande interesse por parte dos consumidores e pelas propriedades nutracêuticas, apresentando-se como alternativa econômica para pequena propriedade (HAN et al., 2004; RASEIRA et al., 2004).

No Brasil, a cultura da framboesa foi introduzida na região de Campos do Jordão, no Estado de São Paulo e atualmente, os principais Estados produtores são Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, com área de

(Recebido em 21 de novembro de 2006 e aprovado em 13 de novembro de 2007)

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

cultivo estimada em 40 hectares (PAGOT & HOFFMANN, 2003). Entre as cultivares já testadas no Brasil, destaca-se a cultivar Batum, que se caracteriza pela baixa exigência em frio, tipo remontante e com frutos de formato oval (RASEIRA et al., 2004).

Visando a resistência de plantas a fungos e outros patógenos, como no caso da framboeseira que sofre o ataque de fungos, as técnicas de cultura de tecidos e DNA recombinante oferecem oportunidades de obtenção de novas cultivares mais resistentes e em menor período de tempo (RASEIRA et al., 2004).

O sucesso para qualquer via de regeneração *in vitro* depende de vários fatores, sendo que os fitorreguladores se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro* (GRATTAPLAGIA & MACHADO, 1998), particularmente o balanço de auxina/citocinina, no meio de cultura. O tipo de explante é outro fator importante para a promoção da organogênese em muitas espécies. Na regeneração de plantas lenhosas, geralmente os explantes mais utilizados são folhas e entrenós de plantas desenvolvidas *in vitro* (ERIG et al. 2004), em menor freqüência ápices caulinares (ROCHA et al., 2004).

A organogênese *in vitro* ocorre com a formação de gemas adventícias, que são denominadas dessa forma por se originarem em locais diferentes daqueles onde se formam no curso normal de desenvolvimento da planta. Essa via de regeneração pode ser indireta ou direta, dependendo da formação ou não de calos, respectivamente (MOURA et al., 2001; ROCHA et al., 2004).

Objetivou-se neste trabalho determinar o tipo de explante e o tipo e a concentração de citocinina que favoreça a organogênese de framboeseira cv. Batum.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas, Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, RS. Como fonte de explante foram utilizadas folhas inteiras e pecíolo de framboeseira cultivar Batum, com aproximadamente 0,4 cm, extraído de material cultivado *in vitro*, mantidos em sala de crescimento, com temperatura e luz controladas. Na inoculação dos explantes, os pecíolos foram colocados, horizontalmente, em contato com o meio nutritivo e as folhas receberam dois cortes transversais à nervura central, sendo colocadas com a parte adaxial em contato com o meio.

O experimento fatorial (2x2x4) constou de dois tipos de explantes (folha e pecíolo); dois tipos de citocininas (2iP e TDZ); e quatro concentrações diferentes de citocininas (0, 5, 10 e 15µM), totalizando 16 tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, e cada repetição constituiu-se de um frasco, contendo 5 explantes.

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescidos de 5,4µM de ANA, 30g L^{-1} de sacarose e 100mg L^{-1} de mio-inositol, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 6,0g L^{-1} e, posteriormente, autoclavado a 121ºC e 1,5 atm, por 20 minutos. Foram utilizados frascos (200mL), com 30 mL de meio de cultura. Após a inoculação, os explantes permaneceram no escuro, a 25 ± 2ºC, por um período de 7 dias, visando diminuir a oxidação fenólica. Em seguida, foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 25 ± 2ºC e densidade de fluxo de fótons do período de luz de 27mmol $m^{-2}s^{-1}$.

A avaliação foi realizada aos 75 dias após a inoculação e as variáveis analisadas foram o número de brotações/explante, a porcentagem de formação de calos e a porcentagem de explantes regenerados e os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan, através do uso do programa estatístico SANEST (ZONTA & MACHADO, 1984).

O desdobramento das médias pelo teste de Duncan mostrou que, quando a concentração de 5µM de TDZ e folha foram utilizados, eles promoveram maior número de brotações; já para pecíolo observaram-se melhores resultados utilizando-se a concentração de 15 µM de TDZ, não diferindo estatisticamente de 5µM e 10µM. As concentrações de 10µM e 15µM de 2iP mostraram-se

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

superiores à de 5µM para folha, não diferindo do tratamento sem essa citocinina. Já para pecíolo, o tratamento sem 2iP mostrou-se superior aos demais, não diferindo estatisticamente de 10 µM (Tabela 1). Souza et al. (1998) observaram que, no cultivo *in vitro* de *Brassica oleracea* L., menores concentrações de TDZ (0,87µM) foram suficientes para induzir à formação de grande número de brotos, em segmentos nodais. Utilizando as citocininas zeatina, TDZ e 2iP na regeneração de brotações de *Vaccinium vitis-idaea*, Debnath & Mcrae (2002) observaram que a zeatina promoveu melhores respostas na indução da regeneração de brotos em todas as concentrações utilizadas, sendo que as concentrações de 20 e 30µM promoveram maior resposta morfogenética.

Para porcentagem de formação de calos, observa-se na Tabela 2 que a adição de TDZ promoveu maiores médias, tanto para folha quanto para pecíolo. Houve diferença entre as fontes de explantes no tratamento sem a adição de TDZ, onde pecíolo apresentou maior formação de calo, com exceção da concentração de 5µM de TDZ, onde folha apresentou médias superiores. As maiores concentrações de 2iP (10 µM e 15µM) promoveram maiores porcentagens de formação de calo, para o explante folha. Para pecíolo, a concentração que promoveu maior calogênese foi 10µM de 2iP. Biasi et al. (2002), em experimento de organogênese, utilizando segmentos radiculares de caquizeiro observaram formação de massa de calo, com grande quantidade de gemas em meios de cultura com combinações de TDZ e ANA. No cultivo *in vitro* de *Vaccinium vitis-idaea* L., Debnath & Mcrae (2002) utilizaram as citocininas zeatina, TDZ e 2iP na regeneração de brotações e observaram que o meio contendo TDZ promoveu maior formação de calo. Também Erig et al. (2004), observaram que o TDZ promoveu maior intensidade de calo na organogênese de *Malus domestica* Borkh. cv. Galaxy e que, na ausência desse regulador no meio de cultura, a formação de calo foi praticamente nula. Erig & Schuch (2005) obtiveram maior intensidade de calos formados em brotos de *M.domestica*, quando utilizaram 15,26µM de TDZ, e também observaram que na ausência desse regulador não houve formação de calo para as cultivares Galaxy, Maxigala e Mastergala.

Para a variável porcentagem de explantes regenerados, pode-se observar que o TDZ mostrou-se superior ao 2iP em todas as concentrações em que eles foram adicionados, sendo que a concentração de 5 µM de TDZ apresentou as maiores médias (Tabela 3). Rocha et al. (2004) observaram que, a utilização de ápice caulinar e TDZ em concentrações que variaram de 5 a 25µM, promoveram maior porcentagem de regeneração em *Pyrus communis* L.. Biasi et al. (2002) obtiveram maior porcentagem de brotações utilizando-se segmentos radiculares de caquizeiro, em meio de cultura sem adição de reguladores. Erig & Schuch (2005) observaram que a porcentagem de regeneração de *M. domestica* foi nula, em tratamento sem adição de TDZ (0µM), isso em razão das citocininas constituírem um grupo de fitorreguladores indispensáveis para promover a divisão celular e a diferenciação dos tecidos.

TABELA 1 – Número médio de brotações em folhas e pecíolos de framboeseira cv. Batum, após 75 dias de cultivo *in vitro*, em meios com diferentes concentrações de TDZ e 2iP. UFPel, Pelotas, RS. 2005.

Citocinina	**TDZ (µM)***				**2iP (µM)***			
	0	5	10	15	0	5	10	15
Folha	0,71 aC	1,21 aA	0,92 aB	0,71 bC	0,71 aA	0,53 aB	0,71 aA	0,71 aA
Pecíolo	0,71 aB	0,89 bA	0,82 bA	0,91 aA	0,74 aA	0,56 aB	0,71 aA	0,53 bB

*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5%.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

TABELA 2 – Porcentagem de formação de calos, em folhas e pecíolos de framboeseira cv. Batum, após 75 dias de cultivo *in vitro*, em meios com diferentes concentrações de TDZ e 2iP. UFPel, Pelotas, RS. 2005.

Citocinina	**TDZ (µM)***				**2iP (µM)***			
	0	5	10	15	0	5	10	15
Folha	0,001bB	90,00 aA	90,00 aA	73,55 aA	0,00 aC	60,86 aB	83,36 aA	77,31 aA
Pecíolo	29,141aB	65,50 bA	83,36 aA	80,19a A	6,64 aC	41,52 bB	90,00 aA	38,36 bB

*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5%.

TABELA 3 – Porcentagem de explantes regenerados em folhas e pecíolos de framboeseira cv. Batum, após 75 dias de cultivo *in vitro*, em meios com diferentes concentrações de TDZ e 2iP. UFPel, Pelotas, RS. 2005.

Concentração (µM)	**Citocinina**	
	TDZ*	**2iP***
0	0,181 c A	0,181 a A
5	49,467 a A	0,135 a B
10	14,684 b A	0,181 a B
15	13,373 b A	0,158 a B

*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5%.

Nas condições em que foi realizado o trabalho, pode-se concluir que, o tipo de explante utilizado não teve influência significativa para a organogênese *in vitro* de framboeseira cv. Batum, e que TDZ é a citocinina mais eficiente, induzindo maior número médio de brotações e maior porcentagem de explantes regenerados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIASI, L. A.; CARVALHO, D. C.; WOLF, G. D.; ZANETTE, F. Potencial organogenético de tecidos caulinares e radiculares de caquizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.29-34, 2002.

ERIG, A. C. & SCHUCH, M. W. Morfogênese *in vitro* de brotos de macieira (*Malus domestica* Borkh) a partir de fragmentos delgado de folhas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.3, p.575-581, 2005.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. Efeito de citocininas e da origem do explante na organôgenese *in vitro* de brotos de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cv. Galaxi. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.9, n.2, p.113-120, 2004.

DEBNATH, S. C. & MCRAE, K. B. An efficient adventious shoots regeneration system on excised leaves of micropropagated lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v.77, n.6, p.744-752, 2002.

GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. p.183-260.

HAN, C.; ZHAO, Y.; LEONARD, S. W.; TRABER, M. G. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria × ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). **Postharvest Biology and Technology**, Pullman, v.33, n.1, p.67-78, 2004.

MOURA, T. L.; ALMEIDA, W. A. B.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.240-245, 2001.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

MURASSHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum,** Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1., 2003, Vacaria-RS. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho 64p. 2003. (Documentos 37).

RASEIRA, M. C. B.; GONÇALVES, E. D.; TREVISAN, R.; ANTUNES, L.E.C. **Aspectos técnicos da cultura da framboeseira**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 24p. 2004.

ROCHA, P. S. G.; SCHUCH, M. W.; BRAGA, E. J. B. Regeneração *in vitro* de brotações de pereira (*Pyrus communis*), cultivar 'Seleta'. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n.4, p. 445-448, 2004.

SOUZA, C. M.; PINTO, J. E. B. P.; RODRIGUES, B. M.; FURTADO, D.F.; MORAIS, A.R.; ARRIGONI-BLANK; F.M. Efeito do Thidiazuron na multiplicação de repolho "*in vitro*". **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.22, n.1, p.52-56, 1998.

ZONTA, E.P., MACHADO, A. A. **SANEST - Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores.** Pelotas, Ufpel, 1984.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS E COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

A revista "**Plant Cell Culture & Micropropagation**" é 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, desde que um dos autores seja sócio e esteja em dia com a ABCTP (Associação de Cultura de Cultura de Tecidos de Plantas). 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.

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

1. SUBMISSÃO:

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 conter o pedido de apreciação na revista ao editor chefe, a declaração de ser um trabalho original e não ter sido submetido a nenhuma outra revista, 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).

Originais: quatro vias impressas em e uma via em CDR, com texto e ilustrações e gráficos. Das 4 vias impressas apenas 1 deve conter os nomes completos dos autores e rodapé na primeira página.
Processador de texto: Word for Windows (version 98, 2000, XP ou 2003)
Redigido em português, inglês ou espanhol
Espaçamento do texto: Duplo. Margens: esquerda (3cm), direita (2cm), inferior e superiores (2,5cm). Cabeçalho e Rodapé (2,5cm).
Papel: formato A4
Fonte: Times New Roman, tamanho 12
Número de páginas: até 14 páginas, numeradas consecutivamente, incluindo as ilustrações
Tabelas: devem fazer parte do corpo do artigo e ser apresentadas no módulo tabela do Word. O título deve ficar acima.
Gráficos, Figuras e Fotografias: devem ser apresentados em preto e branco, nítidos e com contraste, escaneados, inseridos no texto após a citação dos mesmos e também em um arquivo à parte, salvos em extensão "tif" ou "jpg", com resolução de 300 dpi. Os gráficos devem vir também em excel, com letra **Times New Roman, tamanho 10, sem negrito; sem caixa de textos e agrupadas**. em arquivo à parte.
Símbolos e Fórmulas Químicas: deverão ser feitos em processador que possibilite a formatação para o programa Page Maker, sem perda de suas formas originais.

2. ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO

2.1. O artigo científico deve ser apresentado na seguinte seqüência:

TÍTULO

Suficientemente claro, conciso e completo, evitando-se palavras supérfulas, em letras maiúsculas, centralizado, em negrito, em português e inglês.

AUTORES

Máximo de 6 autores
Nomes completos sem abreviação, com chamada para nota de rodapé da primeira página em apenas 1 das 4 vias do manuscrito
Rodapé deve conter: titulação – instituição a que o autor está filiado – endereço da instituição – CEP – cidade, estado – endereço de e-mail, do respectivo autor.

RESUMO

Deve condensar, em um único parágrafo, o conteúdo, expondo objetivos, materiais e métodos, os principais resultados e conclusões em não mais do que 250 palavras. De acordo com as normas da NBR6028

Termos para indexação : no mínimo de três e máximo de cinco. Não devem repetir os termos que se acham no título, podem ser constituídas de expressões curtas e não só de palavras e devem ser separadas por vírgula. 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)

ABSTRACT

Além de seguir as recomendações do resumo, não ultrapassando 250 palavras, deve ser uma tradução próxima do resumo.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Index terms: representam a tradução das palavras-chave para a língua inglesa.

INTRODUÇÃO

Deve apresentar uma visão concisa do estado atual do conhecimento sobre o assunto, que o manuscrito aborda e enfatizar a relevância do estudo, sem constituir-se em extensa revisão e, na parte final, os objetivos da pesquisa. Deve incluir a revisão de literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta seção pode ser dividida em subtítulos, indicados em negrito.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Podem ser divididas em subseções, com subtítulos concisos e descritivos, e conter tabelas e figuras.

CONCLUSÕES

Finalizar com os resultados de acordo com os objetivos do trabalho

AGRADECIMENTOS

Se for o caso ao fim do texto, e antes das Referências Bibliográficas, a pessoas ou instituições. O estilo, também aqui, deve ser sóbrio e claro, indicando as razões pelas quais se fazem os agradecimentos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Devem seguir as normas para citação no texto e na seção própria.

2.2. A comunicação científica deve ser apresentada na seguinte seqüência:

TÍTULO

Suficientemente claro, conciso e completo, evitando-se palavras supérfluas, em letras maiúsculas, centralizado, em negrito, em português e inglês.

AUTORES

Máximo de 6 autores
Nomes completos sem abreviação, com chamada para nota de rodapé da primeira página em apenas 1 das 4 vias do manuscrito
Rodapé deve conter: titulação – instituição a que o autor está filiado – endereço da instituição – CEP – cidade, estado – endereço de e-mail, do respectivo autor.

RESUMO

Deve condensar, em um único parágrafo, o conteúdo, expondo objetivos, materiais e métodos, os principais resultados e conclusões em não mais do que 250 palavras. De acordo com as normas da NBR6028

Termos para indexação : no mínimo de três e máximo de cinco. Não devem repetir os termos que se acham no título, podem ser constituídas de expressões curtas e não só de palavras e devem ser separadas por vírgula. 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)

ABSTRACT

Além de seguir as recomendações do resumo, não ultrapassando 250 palavras, deve ser uma tradução próxima do resumo.
Index terms: representam a tradução das palavras-chave para a língua inglesa.

Texto: sem subdivisão, porém com introdução, material e métodos, resultados e discussão (podendo conter tabelas e gráficos e conclusão subentendidas.

AGRADECIMENTOS

Se for o caso ao fim do texto, e antes das Referências Bibliográficas, a pessoas ou instituições. O estilo, também aqui, deve ser sóbrio e claro, indicando as razões pelas quais se fazem os agradecimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Devem seguir as normas para citação no texto e na seção própria.

3. CASO O ARTIGO CONTENHA FOTOGRAFIAS, GRÁFICOS, FIGURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS, ESSAS DEVERÃO OBEDECER ÀS SEGUINTES NORMAS:

3.1. Fotografias deverão ser apresentadas em **preto e branco**, nítidas e com contraste, inseridas no texto após a citação das mesmas e também em um arquivo à parte, **salvas em extensão "TIFF" ou "JPEG" com resolução de 300 dpi**.

3.2. Figuras deverão ser apresentadas em **preto e branco**, nítidas e com contraste, inseridas no texto após a citação das mesmas e também em um arquivo à parte, **salvas em extensão "TIFF" ou "JPEG" com resolução de 300 dpi**. As figuras deverão ser elaboradas com letra **Times New Roman, tamanho 10, sem negrito; sem caixa de textos e agrupadas**.

3.3. Gráficos deverão ser inseridos após citação dos mesmos, dentro do próprio texto, elaborado preferencialmente em Excel, com letra **Times New Roman, tamanho 10, sem negrito; sem caixa de textos e agrupadas**.

3.4. Símbolos e Fórmulas Químicas deverão ser feitas em processador que possibilite a formatação para o programa **Page Maker** (ex: MathType, Equation), sem perda de suas formas originais.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

OBS: A formatação correta é parte imprescindível para que o trabalho seja devidamente protocolado. Caso este não esteja nas normas, o mesmo será recusado.

4. 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.

4.1. 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.

4.2. 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, l960. 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 *Rhyzopertha dominica* (F.) durante o armazenamento em atmosfera controlada com Co2 e N2**. 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

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

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.informaçãoesociedade.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. (l945) ou (VALLE et al., 1945).
Obs.: Quando forem citados dois autores de uma mesma obra deve-se separá-los pelo sinal & (comercial).

5. 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.

6. OS ARTIGOS NÃO APROVADOS SERÃO DEVOLVIDOS.

7. OS ARTIGOS SERÃO PUBLICADOS EM ORDEM DE APROVAÇÃO.

8. O NÃO-CUMPRIMENTO DESSAS NORMAS IMPLICARÁ NA DEVOLUÇÃO DO ARTIGO AO AUTOR.

9. OS CASOS OMISSOS SERÃO RESOLVIDOS PELA COMISSÃO EDITORIAL.

10. O ARTIGO DEVERÁ SER ENVIADO PARA:

ABCTP

Plant Cell Culture & Micropropagation
Universidade Federal de Lavras
Departamento de Biologia/Setor de Fisiologia Vegetal
Caixa Postal: 3037
CEP 37200-000
Lavras – MG

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

"**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. One of the authors must be associated and have paid all charges required by the ABCTP (Plant Tissue Culture Association) in order to be tax free for publication in **Plant Cell Culture & Micropropagation**. 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.

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

1. SUBMISSION

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.

Original: Four copies and CD with text and illustrations. Only one of the 4 printed copies must contain the full names of the authors and footnote in the first page.
Format: Word for Windows (version 98, 2000, XP ou 2003)
Spacing of the text: Double. 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
Paper: A4 format
Source: Times New Roman, size 12
Number of pages: up to 14 pages, including the illustrations
Tables: Tables should be part of the body of the paper and they must be presented in Word or Excel. The title should be above and be presented in the language in which the article was written and in English. The vertical lines separating the columns should not appear.
Graphs/Figures/Photographs: must be presented in black and white, clear and with contrast, scanned, inserted in the text after citation and also in a separate file (on the same diskette as the article) saved in extension "tif" or "jpg", with resolution of 300 dpi. The title should be below and presented in the language in which the article was written and in English.
Symbols and Chemical Formula: must be presented using a word processor that permits a format Page Maker.

2. STRUCTURE AND ORGANIZATION

2.1. The article should be presented in the following sequence:

TITLE

In English language, containing no more than 15 words in capital letters and bold.

AUTHORS

Maximum of 6 authors
Full names, with call for baseboard note with the following information on first page only 1 copys.They should come in the footnote of the first page in only one of the four printed copies. :
Footnote: titulation – name of the institution to which the authors belong – address of institution – ZIP CODE – city, state – mail address.

ABSTRACT

should be informative and condensed and should explain the objectives, material and methods, results and conclusion of the work in a maximum of 250 words all written in one paragraph.
For articles written in English the abstract should also be presented in Portuguese.

Key words: minimum of three and maximum of five. They should not repeat words that are already in the title. These may include phrases as well as individual words and should be separate by commas.
For articles written in English the key-words should also be presented in Portuguese.

INTRODUCTION

Should present a concise vision of the current level of knowledge that has been achieved within the subject area that the paper will discuss. It should neither give an extensive review nor should it include details about the results and discussion. It should clearly indicate the objectives of the research that was carried out.

MATERIALAND METHODS

This section can contain subdivisions, with subtitles in bold print.

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

Trial version of ABC Amber PDF Merger v3.04, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html

RESULTS AND DISCUSSION

This section can have subsection which begins with concise, descriptive titles in bold print.

CONCLUSIONS

Finishing agree of objectives of work

ACKNOWLEDGEMENTS

If applicable

BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES

They should follow citation norms both in the text and in the appropriated section.

2.2 The Communication should be presented in the following sequence

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

TITLE IN PORTUGUESE;

FULL NAME(S) OF THE AUTHOR(S)

Maximum of 6 authors
Full names, with call for baseboard note with the following information on first page only 1 copys.They should come in the footnote of the first page in only one of the four printed copies.
Footnote: titulation – name of the institution to which the authors belong – address of institution – ZIP CODE – city, state – mail address.

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.

Index terms: (3 to 5) must be described in capital and small letters, and express the content of the article

ABSTRACT AND INDEX TERMS IN PORTUGUESE

Text: with no division but must include introduction, material and methods, results and discussion and conclusion (it may include tables and figures)

ACKNOWLEDGEMENTS

If applicable

BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES

They should follow citation norms both in the text and in the appropriated section.

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

3.1. Photographs must be presented in **black and white**, clear and with contrast, inserted in the text after their citation and also in a separate file (on the same diskette as the article) **saved in extension "TIFF" or "JPEG" with resolution of 300 dpi**.

3.2. Figures must be presented in **black and white**, clear and with contrast, inserted in the text after their citation and also in a separate file (on the same diskette as the article) **saved in extension "TIFF" or "JPEG" with resolution of 300 dpi**. They must be elaborated using **Times New Roman font, size 10, without bold, without text box and arranged**.

3.3. Graphs must be inserted in the text after their citation, elaborated preferentially in Excel, using Times New Roman font, size 10, without bold.

3.4. Symbols and Chemical Formula must be presented using a word processor that permits a format for **Page Maker** (ex: MathType, Equation) without loss of its original form.

4. 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).

5. 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.

6. MANUSCRIPTS NOT APPROVED WON'T BE RETURNED TO THE AUTHOR.

7. ARTICLES WILL BE PUBLISHED ACCORDING TO THE ORDER OF RECEIPT AND APPROVAL.

8. IF ANY OF THESE RULES ARE NOT ATTENDED THE MANUSCRIPT WILL BE RETURNED TO THE AUTHOR.

9. THE NEGLECTFUL CASES WILL BE SOLVED BY THE EDITORIAL COMMITTEE.

10. 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

Trial version of ABC Amber PDF Merger, http://www.processtext.com/abcpdfmg.html