III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas

11 e 12 de setembro de 2012

Aparecida Gomes de Araújo
Ana da Silva Lédo
Editoras técnicas

EMDAGR
EMPRESA DE DESENVOLVIMENTO AGROPECUÁRIO DE SERGIPE
SergipeTec
Sergipe Parque Tecnológico
Embrapa

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Tabuleiros Costeiros
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

III Ciclo de Palestras sobre Cultivo *in vitro* de Plantas

Aparecida Gomes de Araújo
Ana da Silva Lédo
Editoras técnicas

Embrapa
Brasília, DF
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Av. Beira Mar, 3250
49001-970 Aracaju, SE
Fone: (79) 4009-1344
Fax: (79) 4009-1399
www.cpatc.embrapa.br
cpatc.sac@cpatc.embrapa.br

Comitê Local de Publicações da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Presidente: *Ronaldo Souza Resende*

Secretária-executiva: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues* Membros: *Ana Veruska Cruz, Edson Patto Pacheco, Élio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, Joézio Luis dos Anjos, Josué Francisco da Silva Junior, Luciana Marques de Carvalho, Semíramis Rabelo Ramalho Ramos e Viviane Talamini*

Supervisão editorial
Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues

Projeto gráfico, capa e editoração eletrônica
Yann Dias da Silva Maia

1ª edição
CD-ROM (2012): 100 exemplares

Todos os direitos reservados.
A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Tabuleiros Costeiros

Ciclo de Palestras sobre Cultivo in vitro de Plantas (3 : 2012 : Aracaju, SE).
Anais... / III Ciclo de Palestras sobre Cultivo in vitro de Plantas, Aracaju, SE, Brasil, 11 e 12 de setembro de 2012 / editores, Aparecida Gomes de Araújo, Ana da Silva Lédo. – Brasília, DF : Embrapa, 2012.
1 CD-ROM.

ISBN 978-85-7035-102-9

1. Cultivo de tecidos. 2. Cultivo in vitro. 3. Pesquisa. I. Embrapa Tabuleiros Costeiros. II. Araújo, Aparecida Gomes de. III. Lédo, Ana da Silva.

CDD 581.072 4

©Embrapa

Editoras Técnicas

Aparecida Gomes de Araújo
Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe/FAPITEC-SE

Ana da Silva Lédo
Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.ledo@embrapa.br

Comissão Organizadora

Aline Gonçalves Moura Bonfim - analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Ana da Silva Lédo - pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Aparecida Gomes de Araújo - pesquisadora da Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe/FAPITEC-SE

Carlos Roberto Martins- pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Kelly Cristina dos Santos Teixeira - gestora do Sergipe Parque Técnológico (SergipeTec)

Regina Beatriz Bernd - pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues - analista da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Comissão Técnico-científica

Ana da Silva Lédo - pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Aparecida Gomes de Araújo - pesquisadora da Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe/FAPITEC-SE

Carlos Roberto Martins - pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Kelly Cristina dos Santos Teixeira - gestora do Sergipe Parque Técnológico (SergipeTec)

Regina Beatriz Bernd - pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Apresentação

O III Ciclo de Palestras sobre Cultivo *in vitro* de Plantas tem como objetivo divulgar resultados alcançados por instituições no Estado de Sergipe quanto ao cultivo *in vitro* de plantas de importância econômica, além de capacitar profissionais, empresários, laboratoristas, técnicos e estudantes quanto à aplicação de técnicas de cultura de células, tecidos e órgãos vegetais para a multiplicação *in vitro* de plantas.

Em sua terceira edição, a iniciativa surgiu com a parceria entre Embrapa Tabuleiros Costeiros, Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe (Emdagro) e Sergipe Parque Tecnológico (SergipeTec), a partir do projeto de implantação da primeira biofábrica de mudas em Sergipe.

Para a Embrapa Tabuleiros Costeiros e seus parceiros, a realização desse evento, bem como o registro das palestras proferidas e dos resumos expandidos das pesquisas desenvolvidas por estudantes bolsistas e pesquisadores, é motivo de grande satisfação, e ilustra a relevância da área de cultura de tecidos de plantas para a Região Nordeste.

Agradecemos à FAPITEC-SE por viabilizar a realização deste Seminário através do Programa de Auxílio ao Pesquisador para a Realização de Reunião ou Evento Científico e Tecnológico no Estado de Sergipe (PRAEV).

Desejamos aos participantes que aproveitem toda riqueza de conhecimentos apresentados para o fortalecimento da habilidade do diálogo científico e tecnológico na sua essência.

Aparecida Gomes de Araújo
Ana da Silva Lédo
Editoras técnicas

Sumário

Caderno de Palestras

Micropropagação de Espécies Frutíferas Nativas dos Tabuleiros Costeiros.....10

Micropropagação de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares.....15

Aplicação da Cultura de Tecidos para a Multiplicação de Espécies em Extinção: o Caso das Orquídeas.....17

Uso de Microrganismos na Cultura de Tecidos.....23

Micropropagação do Coqueiro.....24

Avanços da Cultura de Tecidos na Micropropagação de Plantas.....28

Produção Comercial de Mudas Micropropagadas em Sergipe.....33

Regulamentação sobre Produção de Mudas em Biofábricas.....39

Avanços da Cultura de Tecidos na Micropropagação de Plantas.....28

Caderno de Resumos Expandidos

Efeito do Estresse Salino no Desenvolvimento *in vitro* de Plântulas de Milho.....43

Efeito de Diferentes Substratos na Aclimatação de Plântulas de Cambuizeiro.....52

Efeito de Diferentes Meios de Cultura na Germinação *in vitro* Do Cambuizeiro.....57

Produção de Mudas de Abacaxizeiro 'Pérola' Utilizando a Técnica do Estiolamento *in vitro*.....61

Propagação *in vitro* de Abacaxizeiro 'Vitória' a partir de Brotos Estiolado.....67

Ambientes de Cultivo e Concentrações de Sacarose no Desenvolvimento *in vitro* de Explantes de Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*).....73

Estudo da Conservação *in vitro* por Crescimento Lento em Coqueiro-anão.....79

Efeito do Manitol na Conservação *in vitro* de Coqueiro-anão.....84

Ácido Giberélico na Cultura de Embriões Zigóticos de Coqueiro-anão-verde.....90

Conservação *in vitro* de dois Genótipos de *Lippia alba* (Mill E. N. Br).....95

Atividade da Bromelina em Plântulas Micropropagadas de Abacaxizeiro cv. Pérola.....103

Meios de Cultura na Redução da Hiperidricidade *in vitro* de *Ocimum basilicum*.....109

Descontaminação de Genótipo de Palma Forrageira Para Cultivo Fotoautotrófico.....115

Contaminação de Explantes de Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) em Diferentes Ambientes e Concentrações de Sacarose.....121

Diferentes Substratos na Aclimatização de Mudas Micropropagadas de *Hyptis pectinata* L.POIT.....127

Otimização do Processo de Micropropagação de Abacaxizeiro cv. Imperial.....134

Propagação *in vitro* de *Hyptis pectinata*.....139

Embriogênese Somática em Cana-de-açúcar (*Saccharum* Spp.).....146

Germinação *in vitro* de *Genipa americana* L.....152

Caderno de Palestras

Micropropagação de Espécies Frutíferas Nativas dos Tabuleiros Costeiros

Ana da Silva Lédo[1]

Introdução

O Brasil possui uma linha contínua de costa Atlântica de 8.000 km de extensão, uma das maiores do mundo. Ao longo dessa faixa litorânea é possível identificar uma grande diversidade de paisagens, como dunas, ilhas, recifes, costões rochosos, baías, estuários, brejos e falésias. Até mesmo os ecossistemas que se repetem ao longo do litoral (praias, restingas, lagunas e manguezais) apresentam diferentes espécies animais e vegetais. Entretanto, grande parte da zona costeira vem sendo cada vez mais devastada pela superpopulação, atividades agrícolas, industriais e a exploração das espécies (MENEZES et al., 2004).

A presença de uma flora bastante diversificada, com alto potencial de exploração comercial, tem sido ameaçada constante e estudos sobre propagação *in vitro* são importantes. Entre as aplicações da propagação *in vitro*, destacam-se: (1) conservação de germoplasma *in vitro*; (2) a aceleração dos programas de melhoramento pela multiplicação de clones superiores, visando à produção de mudas, ao rejuvenescimento de clones selecionados e ao potencial de obtenção de sementes sintéticas (embriões somáticos); (3) a limpeza clonal, na obtenção de culturas livres de microrganismos patogênicos, visando atender à demanda por um processo de propagação clonal sustentável; (4) a possibilidade de patenteamento de processos/ materiais obtidos por meio da biotecnologia; (5) servirem como base para outras técnicas biotecnológicas, como a transformação genética (PENCHEL et al., 2007).

[1] Engenheira-agrônoma, Doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.ledo@embrapa.br.

De acordo com a espécie e os objetivos a serem alcançados, algumas das fases da micropropagação podem ser mais prolongadas e, ou, uma fase pode ser adicionada, bem como outras podem não ser necessárias. A experiência, a estrutura disponível, entre outros fatores, são determinantes na definição da estratégia mais adequada para se alcançar o sucesso desejado (XAVIER; OTONI, 2009).

As principais técnicas utilizadas para a micropropagação de espécies lenhosas são a regeneração por organogênese e por embriogênese somática. Apesar da alta taxa de multiplicação, a embriogênese somática tem apresentado dificuldades de utilização como sistema de micropropagação devido à necessidade de obtenção de um sistema de embriogênese reproduzível em larga escala, a variabilidade genética indesejável introduzida pelo processo, a perda da capacidade regenerativa, devido aos subcultivos sucessivos, e a dificuldade ou impossibilidade de se estabelecer um sistema de indução por embriogênese somática em algumas espécies/genótipos (TITON et al. 2007 citados por XAVIER; OTONI, 2009).

Esses e outros fatores tem direcionado grande parte dos estudos de micropropagação de espécies frutíferas lenhosas para a obtenção de protocolos de organogênese. Entretanto, algumas fases da micropropagação de espécies lenhosas, em especial o estabelecimento, enraizamento e aclimatação, tem sido limitantes para a aplicação dos protocolos em larga escala. Problemas com contaminação, oxidação de explantes, perda do vigor das culturas e dificuldades no enraizamento *in vitro* e *ex vitro* tem sido relatado por diversos autores.

Dentre as espécies frutíferas nativas dos tabuleiros costeiros destacam-se a mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), o jenipapeiro (*Genipa americana* L.), o cambuizeiro (*Myrciaria tenella* O. Berg), o muricizeiro (*Byrsonima verbascifolia*), entre outras, que tem sido alvo de estudos por diversas instituições e universidades.

A mangabeira é sem dúvida uma das espécies mais estudada por diversas instituições. Na micropropagação, em especial para a variedade botânica do Nordeste, tem-se observado aspectos limitantes como o acúmulo de etileno no recipiente de cultivo e perda de vigor em subcultivos (LEMOS et al., 2006). O uso de tampas de vedação dos frascos mais permeáveis tem promovido o aumento da concentração de CO_2 e, simultaneamente, a redução da umidade relativa e da concentração de etileno (LÉDO et al., 2011; SÁ et al., 2012). Segmentos nodais de mangabeira mediano e basal têm sido mais indicados para a organogênese por induzir maior número de nós no primeiro subcultivo (LÉDO et al., 2011; SÁ et al., 2012). Outro aspecto limitante da micropropagação da mangabeira variedade do Nordeste é a etapa de enraizamento das brotações adventícias (LEMOS et al., 2006).

Recentes trabalhos tem demonstrado a capacidade organogenética do jenipapeiro a partir de segmentos internodais em meio MS na presença ou ausência de 1,0 mg de benzilaminopurina (DANTAS et al., 2009; SANTOS-SEREJO et al., 2009). O jenipapeiro também tem apresentado limitações nas fases de enraizamento e aclimatação. Estudos de Rocha et al. (2008) indicam a adição de AIB na concentração de 9,8 μM e o uso de substratos comerciais para o maior desenvolvimento do sistema radicular das mudas na fase de aclimatação. No mesmo trabalho os autores reportam a influência do genótipo nas respostas *in vitro*.

Considerações Finais

Os estudos para o estabelecimento de protocolos de clonagem *in vitro* de espécies frutíferas nativas devem estar associados a programas de conservação de recursos genéticos e melhoramento genético para o melhor aproveitamento da técnica tanto na conservação e clonagem da variabilidade genética existente e para a clonagem de plantas superiores oriundas de cruzamentos.

É importante salientar que não existe um protocolo padrão para clonagem de genótipos da mesma espécie e entre espécies e diversos fatores mencionados anteriormente deverão ser considerados em todas as etapas da micropropagação.

Referências Bibliográficas

COSTA, M.A.P.C.; CARMO, D.O.; SOUZA, F.V.D.; MAGALHÃES, G.L.; HANSEN, D.S. Efeito de diferentes concentrações de GA3 no alongamento de brotações *in vitro* de jenipapo (*Genipa americana*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., Belém, 2002. **Anais.** Belém: SBF, 2002

DANTAS, A.C.V.L.;COSTA, M.A.P. de C.; SILVA, S.A.; SANTOS-SEREJO, J.A. dos. Propagação de fruteiras potenciais para o Nordeste Brasileiro. **Tópicos em Ciências Agrárias**, v.1, p.26-35, 2009.

LEDO, A. da S.; SA, A. J.; SILVA JUNIOR, J. F. da; SILVA, A. V. C.; LEDO, C. A. da S.; DINIZ, L. E.C. Establishment for in vitro propagation and conservation protocols of mangaba tree native of Brazil. **Acta Horticulturae**, v.918, p.177-182, 2011.

LEMOS, E.E.P. de; COSTA, M.A.P. de C.; ALOUFA, M.A.I.; LÉDO, A. da S.; ALMEIDA, W.A.B. de; DANTAS, A.C.V.L.; SILVA, S.A.; SOUZA, F.V.D. Micropropagação. In: SILVA JUNIOR, J.F. da; LEDO, A. da S. (Ed.). **A cultura da mangaba.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. p.125-133.

MENEZES, A.F. de; CAVALCANTE, A.T.; AUTO, P.C.C. **A Reserva da Biosfera da Mata Atlântica no Estado de Alagoas.** Maceió: Gráfica e Editora Poligraf, 56p., 2004. (Caderno da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica: série).

PENCHEL, R.M.; OTONI, W.C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação in vitro. In: A. BORÉM (ed). **Biotecnologia florestal**, Viçosa: UFV, p.75-92, 2007.

ROCHA, M.A.C. da et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.3, p.769-774, 2008.

SA, A.J. ; LEDO, A. da S. ; LEDO, C.A. da S. ; PASQUAL, M. ; SILVA, A.V.C. ; SILVA JUNIOR, J.F. da S. Effect of sealing and explant types on the mangaba micropropagation. **Ciência e Agrotecnologia**, v.36, p.406-414, 2012.

DANTAS, A.C.V.L.;COSTA, M.A.P. de C.; SOUZA, F.D.V.; SANTOS, R.O.S.; SANTOS, L.S.L. Jenipapo. In: SANTOS-SEREJO, J.A. dos; DANTAS, J.L.L.; SAMPAIO, C.V.; COELHO, Y. da S. **Fruticultura tropical**: espécies regionais e exóticas.Brasília: Embrapa informação Tecnológica, p.275-291, 2009.

XAVIER, A.; OTONI, W. Aplicações da micropropagação na clonagem de Eucalyptus no Brasil**. Agronomía Costarricense**,v.33,n.2, p.303-307, 2009.

III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas

Micropropagação de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares

Andréa Santos da Costa[1]

O consumo de cosméticos e medicamentos elaborados a partir de produtos naturais tem crescido nos últimos anos e isso tem estimulado as empresas a investirem em pesquisas com novas substâncias de origem vegetal. Porém alguns fatores podem comprometer o uso das plantas medicinais para esses propósitos, como a heterogeneidade dos indivíduos, devido a variabilidades genética e bioquímica, e dificuldade de multiplicação. Além disso, muitas espécies estão sob forte pressão antrópica, expostas a erosão genética e redução drástica de populações endêmicas o que dificulta a utilização em larga escala.

A grande maioria das plantas medicinais são coletadas em habitat natural e por maior que seja o número de indivíduos numa localidade não são suficientes para atender uma demanda constante e ininterrupta, principalmente quando a espécie tem multi-usos. Apenas o cultivo sistematizado pode garantir produção regular e em larga escala. Para se estabelecer sistemas de cultivo adequados se faz necessário material propagativo como sementes, tubérculos, estolões ou outro tipo estrutura que permita a multiplicação da planta alvo.

Muitas espécies medicinais apresentam problemas com as sementes ou com partes vegetativas que limitam a sua multiplicação em escala. É para essas espécies que as técnicas de cultivo *in vitro* são indicadas. Exemplos importantes são: espécies de *Dioscorea, Digitalis, Chlorophytum, Pysichotria ipecacuanha, Commiphora wightii, Taxus brevifolia, Cinchona* etc. A micropropagação de plantas é a técnica de maior aplicabilidade da cultura de tecidos e representa uma alternativa para multiplicar espécies de interesse econômico, entre as quais as plantas medicinais e aromáticas com valor farmacológico reconhecido.

[1] Engenheira-agrônoma, Doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.ledo@embrapa.br.

Vários protocolos de micropropagação têm sido estudados para diversas espécies. No entanto, o sucesso deste processo depende de alguns fatores, como tipo de explante, meio de cultura, regulador de crescimento, condições ambientais, dentre outros.

O Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal (LCTMV) do Departamento de Engenharia Agronômica da Universidade Federal de Sergipe vem trabalhando desde 2003, com micropropagação e conservação *in vitro* de plantas medicinais e aromáticas. O laboratório contempla ambientes para preparo de meios de cultura, manipulação asséptica ou transferência de cultura, crescimento das culturas, lavagem e esterilização.

O LCTMV atua no desenvolvimento de protocolos de micropropagação e conservação *in vitro* sob crescimento lento. Além disso, dá suporte ao ensino através de estágios supervisionados, bolsas de iniciação científica (PIBIC e PIBIT), e trabalhos de cursos de pós-graduação (Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, Mestrado em Agroecossistemas e Mestrado em biotecnologia e Recursos naturais).

Desenvolve pequisas *in vitro* de espécies de plantas medicinais e aromáticas como: manjericão (*Ocimum basilicum* L.), erva-cidreira-brasileira (*Lippia alba Mill* N.E.BR.), patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth), gerânio (*Pelargonium graveolens* L.), vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty). Outras espécies foram introduzidas recentemente no laboratório como a batata doce (*Ipomea batatas*), bromélias e orquídeas nativas e cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.).

III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas

Aplicação da Cultura de Tecidos para a Multiplicação de Espécies em Extinção: o Caso das Orquídeas

***Aparecida Gomes de Araujo*[1]**

Introdução

A propagação de orquídeas é freqüentemente um empreendimento lento e caro, haja vista que poucas espécies germinam naturalmente suas sementes. Visando superar essa limitação, a técnica de micropropagação tem sido utilizada com bastante sucesso na propagação comercial de várias espécies, principalmente na germinação de sementes, que são muito pequenas, têm pouca reserva e necessitam da associação com fungos para que ocorra germinação natural. Além da germinação *in vitro* de sementes, pode-se utilizar as técnicas de cultura de tecidos como alternativas para acelerar o processo de propagação, reduzindo o tempo necessário para a propagação massal quando comparado com outros métodos convencionais (COSTA et al., 2009).

A cultura assimbiótica, ou semeadura *in vitro* de orquídeas, constitui uma técnica bastante relevante, do ponto de vista comercial e também ecológico. Essa técnica foi primeiramente utilizada por Lewis Knudson em 1922, a qual possibilitou a reprodução de orquídeas por sementes, cultivando-as apenas em meio de cultura contendo sacarose, na ausência do fungo (UNEMOTO et al., 2007). As plantas produzidas dessa forma são altamente interessantes para programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental, resultando em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos simbiontes muitas vezes espécie-específicos (MARTINI et al.,

[1] Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe/FAPITEC-SE, Aracaju, SE.

2001). Assim, dentre as técnicas utilizadas na micropropagação de orquídeas, destacam-se a germinação *in vitro* e a cultura de meristema.

Segundo Prakash et al. (1996), as orquídeas foram as primeiras plantas de importância econômica clonadas pelo método de cultivo *in vitro* em escala comercial. A cultura de meristema em orquídeas teve início com o trabalho de Morel em 1960, que objetivou eliminar doenças e produzir em larga escala mudas geneticamente idênticas de *Cymbidium*.

Neste contexto, a produção de orquídeas a partir de técnicas de cultura de tecidos é uma alternativa viável para a obtenção de um grande número de plantas, em curto espaço de tempo, suprindo, assim, a necessidade dos produtores na aquisição de mudas com qualidade comprovada.

Germinação *in vitro* de Sementes

A formação de sementes tem início com a polinização natural ou artificial que consiste na transferência do pólen (parte masculina) para o estigma (parte feminina) da mesma flor (autopolinização), de flores diferentes na mesma planta (autopolinização) e de flores de plantas diferentes (cruzamentos). No caso da polinização artificial, recomenda-se que sua realização seja uma semana após a abertura da flor, para favorecer o pegamento. Na sequência ocorre a fecundação e consequentemente formação do fruto, que no caso das orquídeas recebe o nome de cápsula. A cápsula pode conter até 1.000.000 de sementes, dependendo da espécie. O processo artificial, direcionado pelo homem, gera uma infinidade de cores e formas diferentes de flores, dependendo das plantas que são cruzadas entre si.

Após a polinização, espera-se de 3-12 meses (dependendo das plantas envolvidas no cruzamento, para que as sementes estejam aptas para a germinação *in vitro*. A época ideal para realização da germinação *in vitro* das sementes é quando as cápsulas apresentam-se com aproximadamente 2/3 de seu período de maturação.

A cápsula deve ser lavada com detergente em água corrente, imersa em álcool etílico 70% (v/v) por cinco minutos e posteriormente em solução de água sanitária 50% (v/v) ou hipoclorito de sódio 2% acrescida de 3 gotas de detergente neutro durante 30 minutos, se possível em agitação, e lavada por três vezes em água destilada autoclavada, em câmara de fluxo laminar. Após desinfestação a cápsula deve ser aberta e as sementes (0,05 g por frasco) inoculadas em frascos com meio de cultura, em ambiente esterilizado (câmaras de fluxo laminar). Os instrumentos (pinças e bisturis) devem ser autoclavados e flambados durante todo o processo. Existem inúmeros meios de cultura que são utilizados na germinação *in vitro*. Na fase de estabelecimento das sementes pode-se utilizarr o meio Knudson C acrescido de 50 mL L^{-1} de água de coco verde ou meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com a metade da concentração dos macronutrientes. A cada 2-3 meses as plântulas são transferidas (repicadas) para novo meio de cultura, até que se obtenha o número ideal de plântulas. Para isso, o meio recomendado é o Knudson C acrescido de 100 g L^{-1} de polpa de banana 'Nanica', 2,0 g L^{-1} de carvão ativado, 20 g L^{-1} de sacarose e 6 g L^{-1} de ágar ou meio MS com metade da concentração de sais minerais, 100 g L^{-1} de polpa de banana 'Nanica', 2,0 g L^{-1} de carvão ativado, 30 g L^{-1} de sacarose e 6 g L^{-1} de ágar. Após essa etapa as plântulas maiores (3 a 5 cm) serão aclimatizadas.

Propagação Vegetativa

É realizada por meio de divisão de touceiras, divisão de bulbos, brotações e *'keikis'* (estruturas de propagação), registrando-se uma baixa taxa de multiplicação sendo que uma nova planta deve conter pelo menos três pseudobulbos (FRÁGUAS et al., 2003).

Propagação por meristemas

Brotos jovens (3 a 5 cm de comprimento), ponta de raízes ou gemas laterais retirados de plantas adultas sadias passam por uma assepsia e em câmara de fluxo laminar, os explantes passam por reduções até atingirem o tamanho de 0,5 a 1,0 cm de comprimento e, em seguida, inoculados, individualmente, em tubos

de ensaio contendo meio de cultura MS com adição de 30 g L^{-1} de sacarose, 2 g L^{-1} de carvão ativado e 6 g L^{-1} de ágar, previamente autoclavado Após inoculados, os tubos são incubados em sala de crescimento.

Após 30 a 60 dias da inoculação, variável conforme o genótipo, as brotações que se apresentarem intumescidas e sem contaminantes, são transferidas para frascos contendo meio MS semissólido suplementado com 0,5 mg L^{-1} de ácido naftaleno acético (ANA) e 2,0 mg L^{-1} de BAP (6-Benzilaminopurina). Fazer repicagens sucessivas (a cada 45 dias) até obter o número de plântulas desejado. Geralmente são realizados 4 a 5 subcultivos.

Antes da aclimatização, as plântulas provenientes tanto da semeadura *in vitro* quanto as de cultura de ápices caulinares ou meristemas, devem ser transferidas para um meio de enraizamento, se não apresentarem raízes. O meio dessa fase pode ser semelhante ao da fase de multiplicação, porém sem regulador de crescimento.

As plântulas permanecerão nesse meio até enraizarem (3 a 4 semanas) e atingirem 3 a 5 cm, quando serão aclimatizadas em casa de vegetação.

Aclimatização

As plântulas bem desenvolvidas e enraizadas são removidas dos frascos e transferidas para estufas ou casas de vegetação, fase denominada de aclimatização. As raízes das plântulas devem ser lavadas para retirada de restos de meio de cultura, a fim de evitar proliferação de fungos no substrato, são acomodadas em bandejas coletivas (sem divisão de células), contendo 1/3 de seu volume (fundo) com brita nº 0 (zero) e 2/3 com substrato que pode ser: pó de coco ou mistura de casca de arroz carbonizada + casca de pínus + fibra de piaçava (3:1:1). Nos primeiros 15 dias devem receber pouca luminosidade (25%), molhadas moderadamente evitando o encharcamento, o que provoca podridão das raízes e pulverizadas com solução de adubo rico em nitrogênio (20-10-10 p.

ex.), uma vez por semana. A luminosidade deve ser aumentada gradativamente. As plântulas permanecem nos coletivos por aproximadamente 2 meses quando são transferidas, inicialmente para vasos nº 1 ou tubetes e posteriormente para vasos maiores para crescimento e desenvolvimento e posterior florescimento (PASQUAL et al. 2005).

No Brasil, há vários materiais com potencial uso como substratos, a exemplo da fibra de coco (desfibrada ou prensada), pó de coco, casca de pínus, piaçava, casca de arroz carbonizada, os de origem mineral (carvão vegetal, brita, argila expandida rígida, vermiculita, tijolo, dentre outros) e os sintéticos, como isopor e espuma fenólica, utilizados como suporte para as plantas (KÄMPF, 2000).

Considerações Finais

Não existe, ainda, um protocolo único adequado para um gênero, espécie, híbrido ou clone, de modo a proporcionar as melhores condições de crescimento/desenvolvimento.

Com a técnica de semeadura em laboratório, é possível produzir grande quantidade de orquídeas de inúmeras espécies e híbridos, com elevada qualidade genética e fitossanitária, flores precoces, em curto espaço de tempo, popularizando-as e aumentando a oferta com preços mais acessíveis.

A comercialização de mudas micropropagadas contribui significativamente com a preservação de genótipos existentes, uma vez que as espécies, em estado silvestre, estão ameaçadas de desaparecer, sobretudo em função da coleta indiscriminada e da destruição de seus habitats.

Referências Bibliográficas

COSTA, M.A.P.C.; PEREIRA, M.J.; ROCHA, M.A.C. da; HANSEN, D.S.; ALVES, R.M. de O.; SOUZA, E. H. de ; GARCIA, F.R. Micropropagação de orquídea. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T.G.(Org.). **Aspectos práticos da micropropagação**

de plantas. 1ª ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009.

FRAGUÁS, F.V.; SOUZA, A.V; PASQUAL, M.; DUTRA, L.F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana.* **Revista Ceres,** Viçosa, v. 50, n. 292, p. 719-726. 2003.

KÄMPF, A.N. **Produção comercial de plantas ornamentais.** Porto Alegre: Ed. Agropecuária. 2000. p. 45-71.

MARTINI, P.C.; WILLADINO, L.; ALVES, G.D.; DONATO, V.M.T. Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por semeadura *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.10, p. 1319-1324, 2001.

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

PASQUAL, M.; ARAUJO, A.G.; RODRIGUES, V.A.; OLIVEIRA, A.C. Cultivo de orquídeas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.26, n.227, p.85-94, 2005.

PRAKASH, L.; LEE, C.L.; GOH, C. J. *In vitro* propagation of commercial orchids: An assessment of current methodologies and development of a novel aproach-Thin section culture. **Journal of Orchid Society India**, New Delhi, v. 10, n. 1/2, p. 3141, 1996.

UNEMOTO, L.K.; FARIA, R.T.; VIEIRA, A.O.S.; DALIO, R.J.D. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, p. 267-269, 2007.

III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas

Uso de Microrganismos na Cultura de Tecidos

***Olmar Baller Weber*[1]**

Resumo

As plantas estabelecem associações com bactérias e fungos que muitas vezes são tratados como patógenos, principalmente na micropropagação. De outro modo, existem evidências experimentais com inoculação de microrganismos do solo ou de plantas que sugerem vantagens da biotização. Benefícios têm sido constatados com aplicação de fungos micorrízicos arbusculares (micorrização), bactérias promotoras de crescimento (bacterização), incluindo grupos funcionais que atuam na solubilização de minerais, na absorção de nutrientes e na indução de resistência de plantas contra patógenos e outros estresses do ambiente. Salienta-se que na aplicação de inoculantes microbianos devem-se levar em conta os aspectos relativos às formulações (tipo de veículo, estirpes, número de células viáveis), a facilidade de transporte, armazenamento e aplicação do produto, bem como a eficiência das estirpes selecionadas em promover aumento da produção das culturas nas diferentes condições de cultivo. Em plantas cultivadas *in vitro* e/ou que passam pelo estádio de mudas no viveiro torna-se fácil a aplicação de inoculantes, sendo possível obter-se uma eficiente colonização das plantas pelos microrganismos selecionados. Assim, considerando a legislação em vigor sobre inoculantes, biofertilizantes e bioproteores de plantas pode-se recomendar o uso de microrganismos benéficos na micropropagação e na formação de mudas, visando seu cultivo em sistemas com baixo uso de insumos agrícolas e a exploração mais sustentável das culturas agronômicas.

[1] Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, olmar.weber@embrapa.br.

Micropropagação do Coqueiro

Regina Beatriz Bernd[1]

O termo micropropagação refere-se às técnicas para propagação de plantas *in vitro*, incluindo-se a cultura de ápices caulinares e segmentos nodais, embriogênese somática e formação de gemas adventícias em explantes, segundo o Glossário de Biotecnologia Vegetal (TORRES et al., 2000).

Dois processos morfogênicos estão envolvidos na micropropagação, são eles a organogênese e a embriogênese. A morfogênese vegetal vem a ser o surgimento de qualquer órgão a partir de células ou tecidos que originalmente não possuem essa forma ou estrutura.

A micropropagação do coqueiro pode se dar pelo cultivo de embriões zigóticos *in vitro* ou pelo processo de embriogênese somática. A embriogênese somática é o processo de formação de embriões similares aos embriões zigóticos, porém a partir de células somáticas, sem que ocorra a fusão de gametas.

Pelas características morfológico-anatômicas do coqueiro e demais palmáceas, que não possuem meristemas axilares vegetativos, a embriogênese somática é a única forma de propagação clonal destas espécies. Esta técnica permite, portanto, a clonagem de genótipos superiores, produzindo plantas com altos graus de homogeneidade. Outra vantagem da técnica é a produção de um elevado número de plantas em pequenas áreas físicas, superando os métodos tradicionais, que produzem apenas uma planta a partir de um fruto e necessitam de grandes espaços. Além disto, as plantas propagadas a partir de uma matriz certificada livre de doenças terão a mesma sanidade e conseqüente alto vigor.

[1] Bióloga, doutora em Ciências Biológicas, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, regina.bernd@embrapa.br.

Os primeiros trabalhos em embriogênese somática área foram obtidos em 1984, utilizando como explantes inflorescências e embriões zigóticos, por Branton e Blake, e Gupta e outros, respectivamente. Em 1992, Buffard-Morel e outros desenvolveram trabalhos a partir de folhas imaturas. Estes três primeiros trabalhos indicavam que o processo era possível, porém, a confirmação de que embriões somáticos estavam realmente sendo produzidos só foi comprovada em 1994, pela equipe de J. L. Verdeil, com uso de técnicas de histologia, que evidenciaram a formação de calos e a diferenciação em embriões somáticos até a regeneração de plantas.

O uso da histologia auxilia nos estudos do processo, podendo levar a um aumento da eficiência. Por exemplo, a viabilidade do calo e seu potencial embriogênico podem ser observados através da presença de células meristemáticas, com citoplasma denso e divisões celulares, e de estruturas pré-embriogênicas com forma e coloração específica. A viabilidade do embrião somático, por sua vez, pode ser comprovada pela presença da protoderme e feixes de procâmbio ligando os meristemas apical e radicular.

Através da investigação histológica da viabilidade dos tecidos, Pérez-Nuñez e outros (2006), usando plúmulas de embriões zigóticos como explantes, detectaram que a inserção de ciclos repetitivos de calogênese e embriogênese secundária possibilitava aumentar enormemente a eficiência da técnica, permitindo a propagação comercial de certos genótipos.

Devido à alta eficiência das plúmulas no processo de propagação *in vitro* por embriogênese somática, este tecido tem sido utilizado para propagar genótipos superiores de coqueiro anão, que são autofecundados. Entretanto, para assegurar a propagação clonal, especialmente em coqueiros gigantes e seus híbridos que possuem fecundação-cruzada, a embriogênese somática deve se dar a partir dos tecidos/células somáticos ou germinativos não fecundados.

Os trabalhos de clonagem que apresentaram sucesso foram obtidos a partir de inflorescências por Verdeil e outros em 1994, de ovários e anteras por Perera

e outros em 2007 e 2008, respectivamente, tendo o último produzido plantas haplóides, de grande importância para os programas de melhoramento genético.

Contudo, os trabalhos de clonagem de coco por micropropagação ainda apresentam resultados insatisfatórios para uma propagação em larga escala, e estudos estão sendo desenvolvidos em vários países para melhorar a eficiência da técnica.

De acordo com os resultados apresentados por pesquisadores de oito países no IV Workshop de Embriogênese Somática para Multiplicação Rápida do Coqueiro, na Conferência Internacional *Coconut Biodiversity for Prosperity*, realizada na Índia em 2010, alguns fatores foram apontados como dificuldades da técnica. Entre eles estão a genótipo-dependência, com variações de resultados planta a planta; as influências da sazonalidade na coleta dos explantes e da fonte de carvão ativado no meio de cultura; e formações de embrióides fusionados e raízes pré-maturas, dificultando a fase de germinação dos embriões somáticos.

Referências Bibliográficas

BRANTON, R. L.; BLAKE, J. In: PUSHPARAJAH, E.; Chew Poh Soon (Ed.). **Proc. Int. Cocoa/Coconuts.** Kuala: Lumpur, 1984. p. I-8.

BUFFARD-MOREL; J.; VERDEIL, J. L.; PANNETIER, C. Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) a partir d'explants foliaires: étude histologique. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 735-741, 1992.

GUPTA, P. K.; KENDURKAR, S. V.; KULKARNI, V. M.; SHIRGURKAR, M. V.; MASCARENHAS, A.. F. Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro*. **Plant Cell Reports**, Springer Verlag, v. 3, p. 222-225, 1984.

PERERA, P. I. P.; HOCHER, V.; VERDEIL, J. L.; DOULBEAU, S.; YAKANDAWALA, D. M. D.; WEERAKOON, L.K. Unfertilized ovary: a novel explant for coconut

(*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, Springer Verlag, v. 26, p. 21-28, 2007.

PERERA, P. I. P.; HOCHER, V.; VERDEIL, J. L.; BANDUPRIYA, H. D. D.; YAKANDAWALA, D. M. D.; WEERAKOON, L. K. Androgenic potential in coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 92, p. 293-302, 2008.

PEREZ-NUÑEZ, M. T.; CHAN, J. L.; SÁENZ, L.; GONZÁLEZ, T.; VERDEIL, J. L.; OROPEZA, C. Improved somatic embryogenesis from *cocos nucifera* (L.) plumule explants, **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant,** v. 42, p. 37-43, 2006.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A.T.; DE SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. D. M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.

VERDEIL, J. L.; HUET, C.; GROSDEMANGE, F.; BUFFARD-MOREL, J. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut *(Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis **Plant Cell Reports**, Springer Verlag, v. 13, p. 218-221, 1994.

Avanços da Cultura de Tecidos na Micropropagação de Plantas

Carlos Roberto Martins[1]; Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho[2]

Introdução

Nos últimos anos a cultura de tecidos vegetais vem se destacando mundialmente em várias frentes do conhecimento científico e tecnológico. Caracterizada como ferramenta biotecnológica, sua evolução se deve, primordialmente, pelo caráter multidisciplinar que lhe é submetido. O envolvimento de várias disciplinas e áreas do conhecimento tem desencadeado avanços significativos em termos de conhecimento e aplicabilidade a muitos entraves na produção de alimentos e na preservação da biodiversidade.

Neste processo evolutivo da micropropagação de plantas é importante reconhecer que a cultura de tecidos vegetais teve várias etapas de (re) descobertas científicas que dimensionam a grandeza de seus feitos e achados científicos, pelo reconhecimento de muitos cientistas e estudiosos que dedicaram principalmente ao longo do século passado em buscar o entendimento dos mecanismos regulatórios da cultura de tecidos vegetais.

Com os primeiros postulados iniciados ao final do século XIX, a cultura de tecidos teve suas descobertas mais evidentes no inicio século XX. Em 1902, o botânico fisiologista Austro-hungaro chamado de Gottlieb Haberlandt foi um dos primeiros pesquisadores a utilizar da teoria da totipotencialidade na manipulação in vitro de vegetais, sendo considerado como o "pai da cultura de tecidos",

[1] Engenheiro-agrônomo, doutor em Fruticultura, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, carlos.r.martins@embrapa.br.
[2] Bióloga, doutora em Ciências Biológicas, pesquisadora Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará, cristina.carvalho@embrapa.br.

essencialmente por explicitar as possibilidades e os primeiros passos rumo a micropropagação de plantas.

Entre os primeiros estudiosos no assunto, amplamente divulgados na literatura, destacam-se os trabalhos realizados por Hanning (1904) com cultivo de embriões imaturos de crucíferas *in vitro* com sucesso; Robbin (1922) e White (1934) em ponta de raízes com as descobertas de auxinas (AIA); cultura de embriões, por La Rue (1936); Gautheret; Nobecourt (1939) estabeleceram um protocolo para a manutenção de cultura de calo de cenoura. Neste mesmo ano, White conseguiu manter calo de fumo em meio contendo AIA- ácido indol acético; enriquecimento de meios nutritivos com água de coco, por van Overbeek, 1941; cultura de ápices meristemáticos caulinares, em 1946 por Ball; em 1949 Morel evidênciou a ausência de vírus em estruturas meristemáticas; em 1955 Miller e, outros pesquisadores, descobriram a primeira citocinina no processo *in vitro*; Skoog e Miller evidenciaram em 1957 o balanço citocininas e auxinas em células de tabaco; em 1958 o estudo de Steward e pesquisadores postularam evidências de embriogênese somática em cenoura*;* em 1960 Bergmann e Cocking desenvolveram o método de isolamento de protoplastos de plantas com enzimas de degradação da parede celular; propagação *in vitro* livre de viroses por Morel (1960), em 1962 com publicação do meio MS por Murashige e Skoog, amplamente utilizado até nos dias de hoje, as plantas haplóides (GUHA; MAHESHWARI, 1964, NITSCH, 1967), de metabolitos secundários (KAUL; STABA, 1967) entre tantos outros, que abriram caminhos para que a cultura de tecidos pudesse desenvolver-se como ciência e avançar em diversas áreas do conhecimento possibilitando diferentes aplicações tecnológicas.

No Brasil, os trabalhos pioneiros com cultura de tecidos foram desenvolvidos no Instituto Biológico, na década de 1950. A primeira equipe de cultura de tecidos foi formada em 1971, na ESALQ, em Piracicaba, SP. Entre 1975 e 1980 foram criados os laboratórios da Universidade de Campinas e da EMBRAPA. Atualmente, a maioria das instituições de ensino e pesquisa possui infraestrutura nesta área, trabalhando com diferentes metodologias de manipulação de plantas *in vitro* e com diversas finalidades.

A propagação *in vitro* vem sendo empregada em escala comercial em diversas regiões do mundo, com destaque para a Europa Ocidental, América do Norte, Ásia, Austrália e Israel (CARVALHO et al., 2011). Estes pesquisadores citam ainda, que no Brasil, a micropropagação tem encontrado barreiras a sua implementação comercial, pelo elevado custo deste tipo de material propagativo, considerando como base a muda convencional.

O segmento da micropropagação de plantas no Brasil vem evoluindo visivelmente em várias frentes. Acontece em termos científicos, tecnológicos, infraestruturais, de ensino e de aperfeiçoamento humano. Apesar das dificuldades financeiras, o crescimento em unidades produtivas que se dedicam a produção de plantas via propagação *in vitro* ocorre indubitavelmente ano após ano. O que também sucede em termos mundiais principalmente na biofabricação de plantas. Há de se destacar a crescente e benéfica massificação da micropropagação nas diversas áreas de conhecimento, em que os mais variados cursos profissionalizantes e universitários têm possibilitado a divulgação da cultura de tecidos como ferramenta biotecnológica essencial à sociedade.

Este reconhecimento é facilmente observado e constatado nas diversas esferas da sociedade. Recentemente, no dia 27 de agosto de 2012, para ser mais preciso, foi publicado no diário oficial da União, a Instrução Normativa nº 22 (DOU de 28/08/2012, nº 167, Seção 1, pág. 2), que tem por objetivo estabelecer as "Normas para a Produção e a Comercialização de Mudas e de Outras Estruturas de Propagação Obtidas por Meio de Cultura de Tecidos de Plantas". Isto se deve a necessidade de se organizar uma cadeia produtiva crescente. Estima-se que no Brasil sejam produzidas 35 milhões de mudas micropropagadas, principalmente de frutíferas, flores e plantas ornamentais na região sudeste. Destaca-se também a forma como vem sendo empregada a micropropagação da cultura da cana-de-açúcar no cenário de grandes culturas.

Temas importantes em termos de aplicação da cultura de tecidos têm demonstrado, através do desenvolvimento tecnológico, o caminho que a propagação *in vitro* irá permear nas próximas décadas. Grandes avanços vêm

sendo obtidos, na utilização de plantas livres de viroses e assemelhados, na propagação em massa (biofábricas), na preservação e intercâmbio de germoplasma (criopreservação), na hibridação interespecífica e intergenérica (superação genética), na obtenção de plantas haplóides, na variação somaclonal e indução de mutação (variabilidade), na produção de metabólitos secundários, na transformação genética e na seleção *in vitro*.

Um novo cenário biotecnológico em termos vegetais se vislumbra, resultando em grandes conquistas científicas, agronômicas e comerciais em muitas espécies vegetais, especialmente as culturas de importância agrícola. Muitos são os envolvidos em todo o mundo na busca da evolução da micropropagação, trazendo verdadeiras revoluções científicas, superando paradigmas na ciência das plantas, desvendando os segredos da cultura de tecidos vegetais e da biotecnologia. Não há dúvidas de que teremos nos próximos anos grandes transformações proporcionadas pela cultura de tecidos vegetais que beneficiarão a sociedade como um todo.

Referências Bibliográficas

ALTMAN,A.; TREVOR, THORPE A. **Plant tissue culture and biotechnology:** perspectives in the history of IAPTC/IAPTC&B/IAPB. Fonte: IAPB 2014. Org/ About/History, 2007.

BARRUETO CID, L. P. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isto? **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 19, p. 16-21, 2001.

CARVALHO, J.M.F.C.; ROCHA, R.W. da C.; PIMENTEL, N.W. **Curso de cultivos de tecidos vegetais**. Campina Grande, 2006. 23p. (Embrapa Algodão. Documentos, 157)

CARVALHO, A.C.P.P. de; SANTOS, E.O.; RODRIGUES, A.A.J. Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil. IN: LEE TSENG SHENG GERALD. (ORG.). **Biofábrica de plantas:** produção industrial de plantas *in vitro*. 1 Ed. São Paulo: ANTIQUA, 2011, p. 379-393.

Produção Comercial de Mudas Micropropagadas em Sergipe

Kelly Cristina dos Santos Teixeira[1] , Ana da Silva Lédo[2], Cláudio José Antunes Pinto[1], Marcos Wandir Nery Lobão[1], Luiz Eduardo Albuquerque de Jesus[1]

Introdução

Uma biofábrica produz mudas vegetais em larga escala utilizando tecnologia avançada multiplicando plantas matrizes selecionadas conforme suas principais características produtivas utilizando partes da planta como ápices caulinares e rizomas. Souza et al. (2009) salienta ainda que as mudas são introduzidas em um meio nutritivo com sais minerais, vitaminas e fitorreguladores (hormônio), em seguida, passam pelos estágios de estabelecimento, multiplicação e enraizamento em sala climatizada e com iluminação controlada. Após a saída do laboratório, são acondicionadas em recipientes com substrato para adaptação ao ambiente natural.

As pesquisas em produção vegetal no mundo tem utilizado como material básico plantas advindas de biofábricas, devido ao rigor exigido na produção, rastreabilidade e controle fitossanitário. O ambiente controlado e a alta multiplicação de mudas permitem que variedades de difícil propagação ou resistentes à doenças possam ser disponibilizadas ao agricultor (BORGES et al., 2004).

O sucesso na produção de mudas micropropagadas de alta qualidade está intrinsecamente relacionado com um projeto arquitetônico bem elaborado e o

[1] Sergipe Parque Tecnológico (SergipeTec), Aracaju, SE, claudio.antunes@sergipetec.org.br, kelly.teixeira@sergipetec.org.br, marcos.wandir@sergipetec.org.br, luizeduardo.jesus@sergipetec.org.br.
[2] Engenheira-agrônoma, Doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.ledo@embrapa.br.

correto dimensionamento dos equipamentos e material de consumo em uma biofábrica ou laboratório de cultura de tecidos. É recomendável que todas as edificações estejam localizadas em ambientes protegidos de poeira, correntes de vento, umidade e fontes potenciais de microrganismos. Preferencialmente, o local destinado a construção, necessita de um acesso facilitado para transporte da produção e insumos. É importante que seja feita uma pesquisa prévia de mercado sobre disponibilidade de fornecedores e mercado consumidor.

Assim, uma biofábrica com a finalidade comercial, destinada exclusivamente à produção em larga escala com base em protocolos estabelecidos tem estrutura ampla e aparelhagem funcionais. No entanto, em se tratando de um laboratório destinado à pesquisa busca-se um espaço reduzido com equipamentos especializados para desenvolvimento de temas específicos.

Os cuidados com a estrutura física da biofábrica se devem a práticas mitigadoras contra contaminações que podem ocorrer no processo de produção de mudas. As contaminações microbianas em cultura de tecidos na fase de micropropagação são passíveis de patogenicidade, e a ação adotada geralmente é a erradicação parcial ou total da cultura como medida de controle. As contaminações por fungo, levedura e bactéria, geralmente não causam a morte do material vegetal, sendo recomendada a retirada do frasco contendo o explante para que não haja contaminação de toda a produção (COSTA et al, 2010). Uma medida importante é o controle das correntes de ar nos ambientes do laboratório impedindo a entrada de poeira e fungos (TEIXEIRA, 2010).

As salas de preparo de meio de cultura, transferência e de crescimento, devem ser isoladas e com circulação de ar controlada. O acesso de pessoas deve ser restrito àquelas que desenvolvem alguma função no setor. Para que não haja uma circulação de material limpo em ambiente com risco de contaminação, deve-se observar o fluxo da produção para otimização do espaço e melhor adequação do tempo de produção. Os tipos de salas e seus tamanhos serão planejadas em função da escala de operação e das espécies a serem micropropagadas.

Os trabalhos desenvolvidos nesses ambientes requerem o uso de água com controle de caraceterística físico-químicas e avaliação constante de pH. Para a purificação o uso de equipamentos como o aparelho de osmose reversa e o deionizador são essenciais. Há um alto consumo de água durante a assepsia inicial de material vegetal, limpeza dos ambientes e lavagem da vidraria. Para tanto recomenda-se a perfuração de um poço artesiano e um tratamento da água visando o controle microbiológico e balanço físico-químico.

Em regiões onde ocorrem frequentes quedas de energia elétrica, é recomendável que se tenha um grupo gerador para fornecer energia elétrica em eventuais emergências, principalmente considerando-se o controle de temperatura e de iluminação nas salas de crescimento. Deve-se observar durante a elaboração do projeto arquitetônico e elétrico o dimensionamento da carga elétrica dos equipamentos para a real necessidade de tensão elétrica para o acionamento destes. As constantes quedas de energia além de danificar os equipamentos são potencias causas para contaminação do material que está sendo processado nas câmaras de fluxo laminar.

Portanto, para que haja sucesso na produção de mudas, é necessário que sejam observados dos os aspectos técnicos durante a elaboração do projeto arquitetônico, elétrico e planejamento da produção.

Desenvolvimento

O panorama da biotecnologia em Sergipe teve uma significativa alteração com a construção na sede do SergipeTec da Biofábrica de Mudas de Sergipe e do Laboratório de Apoio Tecnológico Sarah Brandão, inaugurados em 2010. O projeto surgiu da demanda do governo estadual em atividades de assistência aos agricultures identificando a deficiência de aquisição de mudas de qualidade para melhoria das culturas de abacaxi e banana. O delineamento das metas, projeto arquitetônico e especificação de equipamentos ficou a cargo dos pesquisadores

e consultores contratados que visitaram cinco biofábricas no país. Com isto, foram selecionados e contratados 10 funcionários para a biofábrica custeados pelo SergipeTec.

Durante a execução, de 2007 a 2011, houve a formação de recursos humanos com implementação de 23 bolsas na modalidade tecnológica para alunos de graduação e profissionais. Os 22 bolsistas da área de biotecnologia geraram 12 resumos apresentados em eventos, um artigo em revistas e uma monografia, destes nove bolsistas aprovados em seleção de mestrado e três em doutorado. Um dos bolsistas foi absorvido como responsável técnico da biofábrica após conclusão do mestrado. A difusão do projeto se deu através da realização de sete eventos, exposição da biofábrica em quatro feiras e participação em cinco eventos. Foram ministradas 13 palestras, 10 entrevistas e 86 inserções sobre o projeto na mídia impressa e digital. Estas atividades foram possíveis através das relações institucionais estabelecidas.

O Parque formalizou parcerias técnicas visando a melhoria dos processos da biofábrica e desenvolvimento de pesquisa no laboratório foram firmados contrato com a Embrapa Mandioca e Fruticultura para participar do piloto do selo Boa Biofábrica, contrato para multiplicação de cana-de-açúcar desenvolvida pela Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA) e contrato de parceria para transferência de tecnologia com o Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). O Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação convidou a BioMudaSe a participar da rede de biofábricas. O laboratório recebeu uma bolsista de pós-doutoramento para trabalhos com abacaxi e banana, como desdobramento, foram aprovados dois projetos com o Banco do Nordeste e outro com a FAPITEC/SE.

Foram realizados ajustes para adequação na equipe executora e aquisição de equipamentos utilizando a aplicação financeira e o saldo de recursos após a execução de 22 processos licitatórios no período de 2008 a 2011. A FINEP ainda autorizou a contratação de consultoria para implantar um Sistema Gestão Integrada (SGI) na biofábrica buscando a qualidade dos processos. Como

resultado do implantação do SGI foram elaborados o PCMSO (Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional) e o PPRA (Programa de Prevenção dos Riscos Ambientais).

Conclusão

A implantação da biofábrica e do laboratório dinamizaram a pesquisa sobre produção vegetal a medida em que foram capacitadas pessoas e formalizadas parcerias com instituições de ensino, pesquisa e extensão. As instalações da biofábrica e laboratório no Parque trazem para Sergipe a modernização e um comércio nascente em biotecnologia que contará em 2013 com uma biofábrica para mudas de cana-de-açúcar, uma biofábrica de fungos e um laboratório de controle de qualidade. Desta forma, o SergipeTec se destaca pela busca da melhoria da infraestrutura e capital humano, além de estimular a criação de empresas no setor de biotecnologia em Sergipe.

Referências Bibliográficas

BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. Editores. **O cultivo da bananeira.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, cap. 5, 2004.

COSTA, M. G. C., SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E., OTONI, W. C. Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.(Ed. Tec.) **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Cap.1, 17-59, 2010.

GERALD, L.T. S. Org. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas in vitro**. São Paulo: Antiqua, 1ª. E, 2011.

ROCHA, H. S. **Biofábricas: estrutura física e organização.** In: JUNGHANS, T. G.: SOUZA, A. da S. (Ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p. 121-152.
SOUZA, A.; JUNGHANS, T.G. **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. Brasília: Embrapa, 1ª Ed. 2009.

TEIXEIRA, S.L.; TORRES, A.C. Organização do Laboratório de cultura de Tecidos de Plantas . In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v. 1. p. 71-86, 1998.

Regulamentação sobre Produção de Mudas em Biofábricas

André Barreto Pereira[1]

A Lei no 10.711 de 05/08/2003, regulamentada pelo Decreto no 5.153 de 23/07/2004, criou o Sistema Nacional de Produção de Sementes e Mudas (SNSM) e o Registro Nacional de Sementes e Mudas (RENASEM), com a finalidade de garantir a identidade e a qualidade do material de multiplicação e de reprodução vegetal produzido e comercializado em todo o território nacional. O SNSM compreende atividades relacionadas ao registro nacional de cultivares e à produção, certificação, análise, comercialização e fiscalização do setor. Mais recentemente, foi publicada a Instrução Normativa nº 22 de 27/08/2012, que aprovou as Normas para Produção e a Comercialização de Mudas e de outras Estruturas de Propagação obtidas por meio de Cultura de Tecidos de Plantas. Esta norma estabelece os modelos de formulários e demais procedimentos pertinentes ao processo de produção e comercialização de mudas produzidas em Biofábricas.

A legislação é um instrumento legal para a fiscalização, do que está sendo produzido no país. O artigo 37 estabelece que "estão sujeitas a fiscalização, pelo Ministério da Agricultura, as pessoas físicas e jurídicas que produzam, beneficiem, analisem, embalem, reembalem, certifiquem, armazenem, transportem, importem, exportem, utilizem ou comercializem sementes ou mudas".

[1] Superintendente Federal de Agricultura em Sergipe (SFA/SE), Aracaju, SE.

Além de auxiliar na fiscalizar da produção e do comércio de sementes e mudas estes instrumentos legais visam garantir o cumprimento da legislação federal assegurando ao produtor rural a obtenção de sementes e mudas de alto padrão físico, fisiológico e genético proporcionando-lhe maior produtividade, renda e qualidade de vida no campo.

Segundo o Sistema Nacional de Sementes e Mudas (SNSM), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) possui a função de promover, coordenar, normatizar, supervisionar, auditar e fiscalizar o setor de produção de sementes e de mudas. Os Estados e o Distrito Federal podem elaborar normas e procedimentos complementares, bem como exercer a fiscalização do comércio estadual.

A pessoa física ou jurídica que exerça a atividade de produção e comercialização de mudas e de outras estruturas vegetais por cultura de tecidos de plantas fica obrigada a se inscrever no Registro Nacional de Sementes e Mudas - RENASEM.

A produção de mudas e de outras estruturas vegetais por cultura de tecidos deverá ser realizada a partir de espécies ou cultivares inscritas no Registro Nacional de Cultivares – RNC.

Para habilitar produção de mudas e de outras estruturas vegetais por cultura de tecidos a Unidade de Propagação in vitro, o produtor deverá solicitar ao órgão de fiscalização na Unidade da Federação onde estiver instalada a Unidade de Propagação in vitro, a inscrição da Produção da Unidade de Propagação in vitro, devendo esta ser feita anualmente.

Na comercialização e transporte, as mudas e outras estruturas vegetais produzidas por cultura de tecidos deverão estar identificadas e acompanhadas da respectiva Nota Fiscal, e de cópia do Atestado de Origem Genética ou do Certificado de Mudas ou do Termo de Conformidade, em função de sua classe e categoria.

A fiscalização da produção de mudas em biofábricas tem como função verificar o cumprimento das exigências legais para a produção e a comercialização de mudas e de outras estruturas vegetais obtidas por cultura de tecidos de plantas, visando garantir a sua identidade e a sua qualidade.

Caderno de Resumos Expandidos

Efeito do Estresse Salino no Desenvolvimento *In Vitro* de Plântulas de Milho

Ana Gorete Campos de Azevedo[1], Tatiana Nascimento Silva[2], Ana da Silva Lédo[3]

Resumo

Este trabalho teve por objetivo estudar o crescimento inicial de genótipos de milho cultivados *in vitro*, bem como identificar as variáveis que melhor expressem a tolerância à salinidade. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Foram utilizadas sementes de cinco diferentes cultivares de milho, cultivadas em seis concentrações de NaCl: 0, 25, 50, 75, 100 e 125 mM. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em esquema fatorial 5 X 6 (cinco genótipos de milho e seis níveis de salinidade no meio MS). A germinação das sementes foi influenciada pelas concentrações de NaCl. O comprimento da parte aérea e do sistema radicular foi influenciado pela presença de NaCl. O número de raízes das plântulas não foi influenciado pelas diferentes concentrações de NaCl.

Palavras-chave: estresse salino, *Zea Mays* L., tolerância, salinidade.

[1] Engenheira-agrônoma, pós-graduanda UFS/PROBIOTEC, anagorete@ymail.com.
[2] Engenheira-agrônoma, pós-graduanda UFS/NEREN, tatyaloou@hotmail.com.
[3] Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.ledo@embrapa.br.

Introdução

As plantas estão constantemente expostas a estresses abióticos e dentre eles o estresse salino é um dos que mais comprometem o crescimento e a produtividade das culturas em todo o mundo (VAIDYANATHAN et al., 2003; VEERANAGAMALLAIAH et al., 2007; ISLÃ; ARAGUÉS, 2010). O excesso de sais ocasionados por esse tipo de estresse pode perturbar as funções fisiológicas e bioquímicas das plantas resultando em distúrbios nas relações hídricas e alterações na absorção e na utilização de nutrientes essenciais para as plantas (AMORIM et al., 2010), retardando seu crescimento e reduzindo a produção.

A disponibilidade de nutrientes para as plantas em ambientes salinos é afetada por muitos fatores no ambiente solo - planta. O pH do solo influencia na disponibilidade dos nutrientes, a concentração e as relações entre os elementos podem influenciar a absorção e o transporte, em particular, de um nutriente e indiretamente pode afetar a absorção e a translocação de outros (GRATTAN; LAMENTA, 1994).

As concentrações de sais que restringem o crescimento e manifestam os efeitos tóxicos nas plantas dependem do grau de resistência à salinidade da espécie, bem como do tempo de exposição, do estádio de desenvolvimento e tipo de sal utilizado (FERREIRA; REBOUÇAS, 1992). Em ambientes salinos, o NaCl é o sal predominante e o que causa maiores danos à planta. Os efeitos sobre a nutrição mineral são decorrentes, principalmente, da toxidade dos íons em razão da absorção excessiva do Na^+ e Cl^-, e do desequilíbrio nutricional causado pelos distúrbios na absorção ou distribuição dos nutrientes (YAHYA, 1998). O excesso de Na^+ e, sobretudo, um excesso de Cl^- no protoplasma ocasionam distúrbios em relação ao balanço iônico (K^+ e Ca^{2+} em relação ao Na^+), bem como os efeitos específicos destes íons sobre as enzimas e membranas (FLORES, 1990).

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta de ciclo anual, pertencente à família gramineae, que apresenta baixo ponto de compensação de CO2, alta taxa

fotossintética e baixo consumo de água para a formação de matéria fresca (AZEVEDO NETO; TABOSA, 2000). Essa cultura possui elevado potencial produtivo e acentuada habilidade fisiológica na conversão de carbono mineral em compostos orgânicos, os quais são translocados das folhas e de outros tecidos fotossinteticamente ativos para locais onde serão estocados ou metabolizados. Além disso, apresenta pequena plasticidade foliar, reduzida prolificidade e baixa capacidade de compensação efetiva (ANDRADE, 1995; FANCELLI; DOURADO-NETO, 1997).

Este trabalho teve por objetivo estudar o crescimento inicial de genótipos de milho cultivados *in vitro*, bem como identificar as variáveis que melhor expressem a tolerância à salinidade.

Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Foram utilizadas sementes de cinco diferentes cultivares de milho, cultivadas em seis concentrações de NaCl: 0, 25, 50, 75, 100 e 125 mM.

Após a lavagem em água corrente, as sementes foram submetidas à assepsia em câmara de fluxo laminar com imersão em álcool 70 % por 30 segundos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio 2 % por 20 minutos sob agitação, sendo então lavadas em água estéril por três vezes. O meio de cultura utilizado foi o MS, acrescido de 30 $g.L^{-1}$ de sacarose e gelificado com 6,5 $g.L^{-1}$ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1 e submetido a autoclavagem. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 12 horas de luz.

Após 30 dias as variáveis avaliadas foram porcentagem de germinação (%), altura da parte aérea (cm), comprimento (cm) e número de raízes e viabilidade de acordo com a escala de notas (5: folhas totalmente verdes; 4: início do secamento e morte das folhas; 3: entre 30 e 50% das folhas e brotos mortos; 2:

mais de 50% das folhas mortas e mais de dois brotos vivos e 1: folhas e brotos totalmente mortos).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em esquema fatorial 5 X 6 (cinco genótipos de milho e seis níveis de salinidade no meio MS). As médias das variáveis foram submetidas à análise de variância pelo teste F, as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Resultados e Discussão

Não houve efeito significativo das cultivares, das concentrações de NaCl e interação dos fatores na porcentagem de germinação das sementes de milho (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de germinação de cultivares de milho em diferentes concentrações de NaCl.

	NaCl (mM)						
Cultivar	**0**	**25**	**50**	**75**	**100**	**125**	**Médias**
A	83,33	33,33	66,66	66,66	100	33,33	63,88A
B	33,33	50	66,66	83,33	83,33	83,33	66,66A
C	83,33	50	83,33	83,33	50	50	66,66A
D	83,33	66,66	50	50	83,33	100	72,22A
E	100	66,66	83,33	50	33,33	33,33	61,11A
Médias	76,66a	53,33a	70,00a	66,66a	70,00a	60a	

[1] Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Bonferroni ($P<0,05$).

Houve efeito significativo da concentração de NaCl no comprimento da parte aérea. Na ausência do NaCl foi observada a maior média e na maior concentração do sal observou-se a menor média de comprimento da parte aérea (Tabela 2). Não houve diferenças significativas entre as cultivares e interação dos dois fatores estudados.

Tabela 2. Comprimento da parte aérea (cm) de cultivares de milho em diferentes concentrações de NaCl.

	NaCl (mM)						
Cultivar	**0**	**25**	**50**	**75**	**100**	**125**	**Médias**
A	20	4,33	20	12,66	26,08	13	16,01A
B	13	10,83	17,9	17,58	17,83	17,16	15,72A
C	27,16	10,58	16,83	17,08	9,33	8,16	14,86A
D	23,9	17,66	9,58	13,83	17,83	19	16,87A
E	25,75	17,83	22,16	12,66	9,33	6,16	15,65A
Médias	21,96a	12,25b	17,30ab	14,76ab	15,96ab	12,70b	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Para o comprimento do sistema radicular houve efeito significativo da concentração de NaCl (Tabela 3). Na ausência do sal foi observada maior média e na maior concentração observou-se menor média de comprimento da parte aérea (Tabela 3).

Tabela 3. Comprimento de raiz (cm) de cultivares de milho em diferentes concentrações de NaCl.

	NaCl (mM)						
Cultivar	**0**	**25**	**50**	**75**	**100**	**125**	**Médias**
A	12,5	2,16	13,5	9,33	14,83a	8,16	10,08A
B	8,16	5,33	9,58	8,5	7,91ab	8,66	8,02A
C	14,66	5	9,08	8,58	5,75b	4,16	7,87A
D	12,33	7,66	5,58	5,91	7,83ab	9,75	8,18A
E	11,33	8	12,66	6,5	6,16ab	3,5	8,02A
Médias	11,8a	5,63c	10,08ac	7,76abc	8,5abc	6,85ab	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Não houve diferença estatística entre as diferentes concentrações de NaCl, as cultivares e interação dos dois fatores para o número de raízes (Tabela 4).

Tabela 4. Número de raízes de cultivares de milho em diferentes concentrações de NaCl.

	NaCl (mM)						
Cultivar	**0**	**25**	**50**	**75**	**100**	**125**	**Médias**
A	4,83	0,25	5,66	3,83	6,16	3,33	4,01A
B	3,33	2,66	5	4,66	4,83	6,83	4,55A
C	6,16	3,33	6,33	5,83	4,5	2,83	4,83A
D	5,83	4,16	2,83	3,16	4,5	4,83	4,22A
E	7,5	4,66	6,66	4,16	4,16	2,83	5A
Médias	5,53a	3,01a	5,3a	4,33a	4,83a	4,13a	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Quanto a viabilidade, não houve diferença significativa entre as cultivares em todas as concentrações de NaCl (Tabela 5).

Tabela 5. Médias de viabilidade de plântulas germinadas in vitro em função de diferentes concentrações de NaCl.

NaCl (mM)	Médias
0	2,4A
25	1,63A
50	2,46A
75	1,93A
100	2,5A
125	2,8A

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Uma das explicações mais aceitas para a inibição do crescimento pelo sal é o desvio de energia do crescimento para a manutenção, isto é, a redução na massa seca pode refletir o custo metabólico de energia, associado à adaptação à salinidade e redução no ganho de carbono (RICHARDSON; MCCREE, 1985).

Conclusões

A germinação das sementes foi influenciada pelas concentrações de NaCl. O comprimento da parte aérea e do sistema radicular foi influenciado pela presença de NaCl. O número de raízes das plântulas não foi influenciado pelas diferentes concentrações de NaCl.

Referências Bibliográficas

GRATTAN, S.R., LAMENTA, M. 1994. Mineral nutrient acquisition and response by plants grown in saline environments. In: Pessarakli, M. (Ed.), **Handbook of plant and crop stress**. New York, Marcel Dekker, p. 203-226.

ANDRADE, F.H. Analysis of growth and yield of maize, sunflower and soybean grown at Balcarce, Argentina. **Field Crops Research**, v.41, n.1, p.1-12, 1995.
AZEVEDO NETO, A. D.; TABOSA, J. N. Estresse salino em plântulas de milho: Parte I análise do crescimento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, p.159-164, 2000.

FANCELLI, A.L.; DOURADO-NETO, D. **Tecnologia da produção de milho**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1997. 174p.

VAIDYANATHAN, H.; SIVAKUMAR, P.; CHAKRABARTY, R.; THOMAS, G. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) – differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. **Plant Science**, v.165, p.1411-1418, 2003.

VEERANAGAMALLAIAH, G.; CHANDRAOBULREDDY, P.; JYOTHSNAKUMARI, G.; SUDHAKAR, C. Glutamine synthetase expression and pyrroline-5-carboxylate reductase actvity influence proline accumulation in two cultivars of foxtail millet (*Setaria italic* L.) with differential salt sentivity. **Environmental and Experimental Botany**, v.60, p.239-244, 2007.
ISLÃ, R.; ARAGUÉS, R. Yield and plant ion concentrations in maize (*Zea mays* L.) subject to diurnal and nocturnal saline sprinkler irrigations. **Field Crops Research**, v.116, p.175-183, 2010.

AMORIM, A.V.; GOMES-FILHO, E.; BEZERRA, M.A.; PRISCO, J.T.; LACERDA, C.F. Respostas fisiológicas de plantas adultas de cajueiro anão precoce à salinidade. **Revista Ciência Agronômica**, v.41, p.113-121, 2010.

FERREIRA, L.G.R.; REBOUÇAS, M.A.A. Influência da hidratação/desidratação de sementes de algodão na superação de efeitos da salinidade na germinação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n.4, p.609-615, 1992.

YAHYA, A. Salinity effects of growth and uptake and distribution on sodium and some essential mineral nutrients in sesame. **Journal of Plant Nutrition**, v.21, n.2, p. 1439-1451. 1998.

FLORES, H.E. Polyamines and plant stress In: LASCHER, R.G.; CUMMING, J.R. **Stress responses in plants**: adaptation and acclimation mechanisms. New York, p.217-39. 1990.

RICHARDSON, S.G.; McCREE, K.J. Carbon balance and water relations of sorghum exposed to salt and water stress. **Plant Physiology**, v.79, 1015-1020. 1985.

Efeito de Diferentes Substratos na Aclimatação de Plântulas de Cambuizeiro

Luciana Borin Barin[1], Ana da Silva Lédo[2], Ana Veruska Cruz da Silva[3]

Resumo

O objetivo do trabalho foi de avaliar o efeito de diferentes substratos na aclimatação de dois tipos de cambuizeiro. O estudo foi realizado na Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Plântulas de cambuizeiro dos tipos Amarelo e Roxo foram transferidas para recipientes plásticos com capacidade de 300 cm^3, contendo os seguintes substratos esterilizados: S1- solo e pó de casca de coco seco - SPC (1:1, em volume); S2-solo, areia lavada e pó de casca de coco seco - SAPC (1:1:1, em volume) e S3-substrato comercial Biomix ®- SC. As mudas foram aclimatizadas por 60 dias em telado sombreado a 50% com sistema de irrigação por microaspersão. A cada sete dias foi realizada a suplementação de macro e micronutrientes por meio de solução com metade da concentração de sais do meio MS. Os substratos SPC, SAPC e SC são adequados para aclimatação de plântulas de Cambuí germinadas *in vitro* e o tipo Amarelo apresenta maior vigor na aclimatação.

Palavras-chave: *Myrciaria tenella* O. Berg, propagação, mudas

[1] Aluna de pós-graduação, Universidade Politécnica de Madri, lucianaborinbarin@hotmail.com.
[2] Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.ledo@embrapa.br.
[3] Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.veruska@embrapa.br.

Introdução

Dentre as espécies de frutíferas nativas brasileiras pouco conhecidas e que são fontes de nutrientes, encontra-se o cambuí (*Myrciaria tenella* O. Berg), especificamente pertencente à Família Myrtaceae, e que ocorre do Maranhão ao Rio Grande do Sul, estendendo-se até a Argentina. Em Sergipe já foram observadas algumas populações naturais, especificamente, em Itaporanga d'Ajuda e Pirambu (MUNIZ, 2009). Seus frutos são do tipo bagas globosas, glabras e brilhantes, de cor vermelha ou violácea escura quando maduras. Além da produção de frutos apresenta importância ao paisagismo e à produção de madeira (LORENZI, 2000). São poucos os relatos na literatura sobre estudos de produção de mudas de cambuizeiro. A aclimatização de plantas tem sido um grande entrave na propagação *in vitro* de muitas espécies. O substrato, por meio de suas características químicas, físicas e biológicas, exerce grande influência na adaptação e desenvolvimento inicial das plantas em condições naturais. Assim, é fundamental a determinação dos substratos adequados para a aclimatização, os quais devem garantir a sustentação mecânica do sistema radicular, a estabilidade da planta, o suprimento de água e nutrientes e as trocas gasosas entre as raízes e o ar atmosférico. A utilização de substratos alternativos, que sejam viáveis para a aclimatização é de grande relevância, pois o aproveitamento de resíduos da agroindústria em práticas agrícolas apresenta-se como uma alternativa para a solução de problemas sociais e ambientais (SILVEIRA et al., 2002).

O objetivo do trabalho foi de avaliar o efeito de diferentes substratos na aclimatação de dois tipos de cambuizeiro.

Material e Métodos

O estudo foi realizado na Embrapa tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE com plântulas germinadas *in vitro* de dois tipos de cambuizeiro: Tipo Amarelo e Tipo Roxo, oriundos de população natural do Campo experimental da Embrapa localizado no município de Itaporanga d'Ajuda, Sergipe, Brasil (11º 07' de latitude Sul e 37º 10' de longitude Oeste).

As plântulas foram transferidas para recipientes plásticos com capacidade de 300 cm^3, contendo os seguintes substratos esterilizados: S1- solo e pó de casca de coco seco - SPC (1:1, em volume); S2-solo, areia lavada e pó de casca de coco seco - SAPC (1:1:1, em volume) e S3-substrato comercial Biomix ®- SC. O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3 (dois tipos de cambuí x três substratos) com cinco repetições. Cada parcela experimental foi composta de cinco recipientes com uma muda.

As mudas foram aclimatizadas por 60 dias em telado sombreado a 50% com sistema de irrigação por microaspersão. A cada sete dias foi realizada suplementação de macro e micronutrientes por meio de solução com metade da concentração de sais do meio MS.

Aos 60 dias após a transferência para condições *ex vitro* foram realizadas as seguintes avaliações: porcentagem de sobrevivência e número de pares de folhas. As médias foram submetidas à ANAVA e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2010).

Resultados e Discussão

Não foi observado efeito do tipo de Cambuí, do substrato e nem a interação dos fatores na sobrevivência das plântulas (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência de plântulas de cambuizeiro aclimatadas em diferentes substratos.

Meio de Cultura	Tipo Amarelo	Tipo Roxo	Médias
SPC	91,67	83,33	87,50A
SAPC	91,67	100	95,83A
SC	90,91	69,23	79,17A
Médias	91,43a	83,78a	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha não diferem entre si a 5% pelo teste de Tukey.

Houve efeito do tipo de Cambuí na emissão de folhas em plântulas de cambuizeiro (Tabela 2). Não houve efeito do substrato e nem a interação dos fatores no número de pares de folhas.

Tabela 2. Número de pares de folhas emitidas em plântulas de cambuizeiro aclimatadas em diferentes substratos.

Meio de Cultura	Tipo Amarelo	Tipo Roxo	Médias
SPC	3,58	2,33	2,95A
SAPC	2,91	2,50	2,70A
SC	3,00	2,15	2,54A
Médias	3,17a	2,32b	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha não diferem entre si a 5% pelo teste de Tukey.

As plântulas de cambuizeiro tipo Amarelo apresentaram, em média, maior vigor na fase de aclimatação com a emissão de 3,17 pares de folhas.

Conclusões

Os substratos SPC, SAPC e SC são adequados para aclimatação de plântulas de Cambuí germinadas *in vitro* e o tipo Amarelo apresenta maior vigor na aclimatação.

Referências Bibliográficas

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia,** v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

LORENZI, H. *Árvores Brasileiras*. 3. ed. São Paulo: Plantarum, v.1, p.264, 2000.
MUNIZ, A. V. C. **Cambuí:** uma delícia nativa. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009 (folder).

SILVEIRA, E. B.; RODRIGUES, V. J. L. B.; GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; MESQUITA, J. C. P. Pó de coco como substrato para a produção de mudas de tomateiro. **Horticultura Brasileira,** Brasília, v. 20, n. 2, p. 211-216, 2002.

III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas

Efeito de Diferentes Meios de Cultura na Germinação *In Vitro* do Cambuizeiro

Luciana Borin Barin[1], Ana da Silva Lédo[2], Ana Veruska Cruz da Silva[3]

Resumo

São poucos os relatos na literatura sobre estudos do comportamento do cambuizeiro *in vitro.* O objetivo do trabalho foi de avaliar o efeito de meios de cultura na germinação *in vitro* de dois tipos de cambuizeiro. O estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Foram utilizadas sementes extraídas de frutos de dois tipos de cambuizeiro: Tipo Laranja e Tipo Roxo. Após a extração, as sementes foram submetidas à assepsia com álcool 70% por um minuto, hipoclorito de sódio comercial a 2-2,5% por 20 minutos e tripla lavagem em água estéril. As sementes foram inoculadas nos seguintes meios de cultura: T1-meio de MS + 30g/L de sacarose, T2-meio ½ MS + 15 g/L de sacarose e T3-testemunha 0MS. O meio 0MS proporciona 100% porcentagem de germinação *in vitro* e o meio ½ MS maior desenvolvimento em altura de plântulas de cambuizeiro.

Palavras-chave: *Myrciaria tenella* O. Berg, propagação, fruticultura.

[1] Aluna de pós-graduação, Universidade Politécnica de Madri, lucianaborinbarin@hotmail.com.
[2] Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.ledo@embrapa.br.
[3] Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.veruska@embrapa.br.

Introdução

Dentre as espécies de frutíferas nativas brasileiras pouco conhecidas e que são fontes de nutrientes, encontra-se o cambuí (*Myrciaria tenella* O. Berg), especificamente pertencente à Família Myrtaceae, e que ocorre do Maranhão ao Rio Grande do Sul, estendendo-se até a Argentina. Em Sergipe já foram observadas algumas populações naturais, especificamente, em Itaporanga d'Ajuda e Pirambu (MUNIZ, 2009). Seus frutos são do tipo bagas globosas, glabras e brilhantes, de cor vermelha ou violácea escura quando maduras. Além da produção de frutos apresenta importância ao paisagismo e à produção de madeira (LORENZI, 2000). São poucos os relatos na literatura sobre estudos do comportamento do cambuizeiro *in vitro.* O objetivo do trabalho foi de avaliar o efeito de meios de cultura na germinação *in vitro* de dois tipos de cambuizeiro.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Foram utilizadas sementes extraídas de frutos de dois tipos de cambuizeiro: Tipo Laranja e Tipo Roxo, oriundos de população natural do Campo experimental da Embrapa localizado no município de Itaporanga d'Ajuda, Sergipe, Brasil (11º *07' de latitude Sul e 37º 10' de longitude Oeste).*

Após a extração, as sementes forma submetidas à assepsia com álcool 70% por um minuto, hipoclorito de sódio comercial a 2-2,5% por 20 minutos e tripla lavagem em água estéril. As sementes foram inoculadas nos seguintes meios de cultura: T1-meio de cultura MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) + 30g/L de sacarose, T2-meio com metade da concentração de sais do MS + 15 g/L de sacarose e T3-testemunha água e ágar (0MS). Após a inoculação, os frascos foram mantidos em sala de crescimento (25 ± 2°C, 12 horas de luz e intensidade luminosa de 60 μmol/m^2/s).

O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3 (dois tipos de cambuí x três meios de cultura) com cinco repetições. Cada parcela experimental foi composta de dois tubos de ensaio com uma muda.

Foram avaliadas a porcentagem de germinação e a altura as plântulas aos 120 dias após a inoculação e as médias submetidas à ANAVA e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2010).

Resultados e Discussão

Houve efeito significativo do tipo de meio de cultura na porcentagem de germinação *in vitro*. Na ausência dos sais do meio de cultura MS houve 100% porcentagem de germinação (Tabela 1). Não foi observado efeito do tipo do cambuizeiro na porcentagem de germinação.

Tabela 1. Porcentagem de germinação in vitro de sementes de cambuizeiro em diferentes meios de cultura.

Meio de Cultura	Tipo Laranja	Tipo Roxa	Médias
MS	50	50	50B
½ MS	50	50	50B
0 MS	100	100	100A
Médias	83,33a	83,33a	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha não diferem entre si a 5% pelo teste de Tukey.

Para a altura das plântulas, houve efeito significativo apenas do meio de cultura (Tabela 2). As plântulas mantidas no meio de cultura ½ MS apresentaram, em média, maior desenvolvimento em altura, não havendo diferenças entre os tipos e interação entre os fatores.

Tabela 2. Altura (cm) de plântulas de cambuizeiro germinadas in vitro em diferentes meios de cultura.

Meio de Cultura	Tipo Laranja	Tipo Roxa	Médias
MS	3,25	2,64	2,95B
½ MS	3,33	4,95	4,14A
0 MS	2,95	3,30	3,13AB
Médias	3,17a	3,76a	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na coluna, e minúscula, na linha não diferem entre si a 5% pelo teste de Tukey.

Os meios 0 MS e ½ MS apresentam potencial para estabelecimento de protocolos de propagação *in vitro* de cambuizeiro, diminuindo os custos de produção, por demandarem menor concentração dos sais do meio MS para o desenvolvimento de plântulas

Conclusões

O meio 0MS proporciona 100% de germinação *in vitro* e o meio ½ MS maior desenvolvimento em altura de plântulas de cambuizeiro.

Referências Bibliográficas

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia,** v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

LORENZI, H. *Árvores Brasileiras*. 3. ed. São Paulo: Plantarum, v.1, p.264, 2000.
MUNIZ, A. V. C. **Cambuí:** uma delícia nativa. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009 (folder).

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.437-497, 1962.

III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas

Produção de Mudas de Abacaxizeiro 'Pérola' Utilizando a Técnica do Estiolamento *In Vitro*

Aparecida Gomes de Araujo[1], Milena M. de J. Ribeiro[2], Zilna B. de R. Quirino[3], Ana da S. Lédo[4], Jaci L. Vilanova-Neta[5]

Resumo

Objetivou-se otimizar a multiplicação do abacaxizeiro por meio do estiolamento *in vitro* com uso de sacarose e ácido giberélico e regeneração em diferentes consistência de meio de cultura e condições de luz. Rizomas de abacaxizeiro com 1 cm foram transferidos para frascos contendo meio MS semissólido (6 gL^{-1} de ágar) com os diferentes tratamentos [ácido giberélico (GA_3) (0; 2,5; 5,0 e 10,0 mgL^{-1}) x sacarose (15, 30 e 45 gL^{-1})]. Após estiolados, os brotos foram transferidos para meio MS líquido estacionário e MS semissólido, em condições de sala de crescimento (luz artificial) e casa de vegetação (luz natural), totalizando quatro tratamentos. O método do estiolamento *in vitro* é viável sendo recomendado o meio MS contendo de 30 a 45 g/L de sacarose para alongamento caulinar e para a regeneração dos segmentos, o meio MS líquido e incubação dos frascos em luz artificial.

Palavras-chave: *Ananas comosus* L., carboidrato, giberelina, multiplicação *in vitro.*

[1] Engenheira-agrônoma, Doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe (Emdagro), Aracaju, SE, agaraujo2003@hotmail.com.
[2] Engenheira-florestal, bolsista da Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe (Emdagro), Aracaju, SE, milenarjm@gmail.com.
[3] Engenheira-agrônoma, mestre em Agroecossistemas, Aracaju, SE, zilna_br@hotmail.com.
[4] Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.ledo@embrapa.br.
[5] Mestranda, Universidade Tiradentes (UNIT), Aracaju, SE, jaci_vilanova@yahoo.com.br.

Introdução

A micropropagação é a técnica mais utilizada e demandada para multiplicar diversas espécies vegetais, com aplicações práticas comprovadas (ERIG; SCHUCH, 2005). Em escala comercial, o sucesso dessa tecnologia depende do desenvolvimento de protocolos mais eficientes e de menor custo, bem como da capacidade da planta produzida em superar, sem grandes estresses, a transferência para condições *ex vitro.* A técnica do estiolamento *in vitro* (cultivo na ausência de luz) durante a multiplicação permite o alongamento caulinar, podendo seus segmentos nodais serem utilizados na propagação vegetativa (SUZUKI et al. 2004), eliminando a constante necessidade por subcultivos e reduzindo a manipulação, número de frascos envolvidos no processo de cultivo *in vitro* e o espaço laboratorial. Dessa forma, objetivou-se otimizar a multiplicação do abacaxizeiro por meio do estiolamento *in vitro* com uso de sacarose, ácido giberélico e regeneração em diferentes tipos de luz e meios de cultivo.

Material e Métodos

Brotações de abacaxizeiro já estabelecidas *in vitro* foram desfolhadas completamente, restando apenas a porção basal com 1 cm, que foram transferidos para frascos contendo 30 mL do meio MS semissólido com os diferentes tratamentos os quais foram constituídos por concentrações de ácido giberélico (GA_3) (0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg L^{-1}) em combinação com sacarose (15, 30 e 45 g L^{-1}). O meio foi solidificado com ágar (6 g L^{-1}) e teve seu pH ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem a 121ºC, pressão de 1,1 atm por 20 minutos e, em seguida as culturas foram incubadas no escuro a 25 ± 2ºC, por dois meses. Após esse período, as plântulas foram avaliadas por meio do número de brotos, número de nós, número de raízes e comprimento da parte aérea. O experimento foi instalado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4x3, num total de 12 tratamentos com seis repetições composta por três explantes cada uma. Após as avaliações, os brotos estiolados foram submetidos à regeneração. Para isso, o sistema radicular dos brotos

estiolados foi removido e os segmentos caulinares colocados horizontalmente em frascos contendo 20 mL de meio MS líquido estacionário e MS semissólido (6 g/L de ágar), em condições de sala de crescimento (luz artificial) e casa de vegetação (luz natural), totalizando quatro tratamentos. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) e cada repetição constitui-se de um frasco contendo cinco segmentos caulinares estiolados e cada um contendo duas gemas. Aos 60 dias, foi avaliado o número de brotos regenerados a partir de cada segmento estiolado. Os dados de todos os experimentos foram submetidos à análise e as médias comparadas pelo teste de Tukey, do programa Sisvar, a 5% de probabilidade ou realizado regressão polinomial.

Resultados e Discussão

Após 60 dias de incubação, o número de brotos, bem como o número de raízes, tiveram influência da concentração de sacarose utilizada, sendo 45 g/L eficaz na obtenção de maior número de brotos (3,28) e a de 15 g/L responsável pelo maior número de raízes (1,3), conforme Figuras 1A e 1B. Altas concentrações de sacarose no meio podem aumentar a taxa de contaminação, a qual interferirá negativamente na sobrevivência e no desenvolvimento das plântulas durante a aclimatização (SOUZA et al. 2007).

Apesar de o número de nós ter sido significativo para o fator ácido giberélico, a ausência do regulador de crescimento favoreceu a emissão dos mesmos (5,28), conforme Figura 1C. Concentrações crescentes do fitorregulador reduziram o número de nós emitidos de forma linear. Os dados obtidos corroboram com os de Moreira et al., (2003).

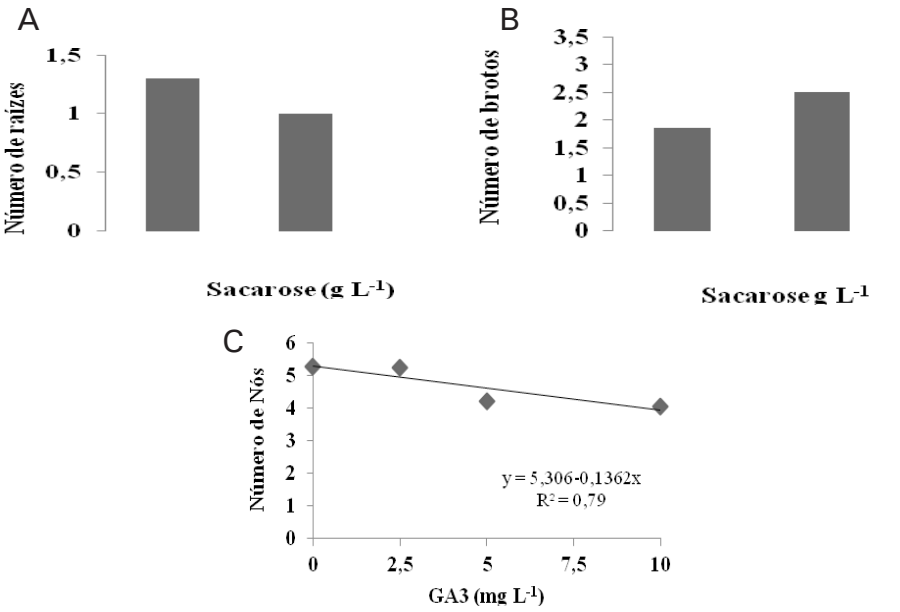

Figura 1. Número de brotos (A) e Número de raízes (B) de brotos estiolados e cultivados em diferentes concentrações de sacarose; e Número de nós (C) oriundos de segmentos estiolados de abacaxizeiro cv. Pérola cultivados em diferentes concentrações de ácido giberélico (GA3).

O número de brotos regenerados por número de nós bem como o número de brotos total apresentaram significância para os tratamentos testados.

Melhores resultados de regeneração *in vitro* de brotos da cv. Pérola foram obtidos em meio de cultura MS líquido e em frascos mantidos em luz artificial ou sala de crescimento (Tabela 1). Nota-se que com o uso do meio líquido apresentou melhores resultados em comparação ao meio sólido, independente do ambiente. Os brotos obtidos em meio sólido, independente do ambiente de cultivo, se apresentavam amarelados e com menores comprimento.

Tabela 1. Número de brotos regenerados por nó (NBR/nó) e número de brotos regenerados por frasco (NBR/frasco) a partir de segmentos estiolados e cultivados em diferentes ambientes e consistência de meios de cultura.

Tratamento	NBR/nó	NBR/frasco
Luz artificial e meio líquido	4,42 a	18,00 a
Luz artificial e meio sólido	1,09 b	5,33 b
Luz natural e meio líquido	1,52 ab	8,00 b
Luz natural e meio sólido	1,02 b	4,67 b

Dados seguidos de mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey.

Conclusões

O método do estiolamento *in vitro* é viável para abacaxizeiro 'Pérola', sendo recomendado o meio MS contendo de 30 a 45 g/L de sacarose para alongamento caulinar e para a regeneração dos segmentos, o meio MS líquido e incubação dos frascos em luz artificial (sala de crescimento).

Agradecimentos

Ao CNPq, à Fapitec-SE, ao Sergipetec e à Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Referências Bibliográficas

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p. 961-965, jul-ago. 2005.

MOREIRA, M.A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J.G.; FRÁGUAS, C.B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, p. 1002-1006, set-out. 2003.

SOUZA, G.C.; CLEMENTE, P.L.; ISAAC, V.L.R.; FARIA, S.P.; CAMPOS, M.R.C. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana e Schomburgkia crispa.* **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p.405-407, jul. 2007.

SUZUKI, R.M.; KERBAUY, G.B.; ZAFFARI, G.R. Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catasetum fimbriatum*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.161, p.929-935, aug. 2004.

III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas

Propagação *In Vitro* de Abacaxizeiro 'Vitória' a partir de Brotos Estiolados

Aparecida Gomes de Araujo[1], Ana da S. Lédo[2], Milena M. de J. Ribeiro[3], Camila S. Almeida[4], Josefa G. S. Santana[5]

Resumo

O estiolamento *in vitro* de abacaxizeiro tem a vantagem de evitar injúria na zona de regeneração e impedir a formação de calo o que pode aumentar o aparecimento de variantes somaclonais. Assim, objetivou-se otimizar a multiplicação do abacaxizeiro por meio do estiolamento *in vitro* com uso de sacarose e ácido giberélico e regeneração em diferentes consistência de meio de cultura e condições de luz. Rizomas de abacaxizeiro com 1 cm foram transferidos para frascos contendo meio MS semissólido (6 gL^{-1} de ágar) com os diferentes tratamentos [ácido giberélico (GA_3) (0; 2,5; 5,0 e 10,0 mgL^{-1}) x sacarose (15, 30 e 45 gL^{-1})]. Após estiolados, os brotos foram transferidos para meio MS líquido estacionário e MS semissólido, em condições de sala de crescimento (luz artificial) e casa de vegetação (luz natural), totalizando quatro tratamentos. Após 60 dias, observou-se que o método do estiolamento *in vitro* é viável para abacaxizeiro, sendo recomendado o meio MS contendo 30 g/L de sacarose para a cv. Vitória sem a presença do regulador de crescimento. A regeneração de plantas a partir de brotos estiolados é recomendada em meio MS líquido, sendo os frascos incubados em sala de crescimento (luz artificial).

Palavras-chave: *Ananas comosus* L., carboidrato, giberelina.

[1] Engenheira-agrônoma, Doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe (Emdagro), Aracaju, SE, agaraujo2003@hotmail.com.
[2] Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.ledo@embrapa.br.
[3] Graduanda em Engenharia Florestal, bolsista da Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe (Emdagro), São Cristovão, SE, milenarjm@gmail.com.
[4] Engenheira-agrônoma, mestranda em Biotecnologia, bolsista da Universidade Federal de Sergipe (UFS) São Cristovão, SE, kmilinhafsa@hotmail.com.
[5] Engenheira-agrônoma, grasiela_agro@hotmail.com.

Introdução

A micropropagação de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.), por meio de segmentos nodais estiolados foi relatada, pela primeira vez, por Kiss et al. (1995). Alguns resultados da aplicação do estiolamento para cultivares comerciais de abacaxizeiro são promissores e apontam que esse método tem a vantagem de evitar injúria na zona de regeneração e impedir a formação de calo o que poderia aumentar o aparecimento de variantes. Além disso, pode apresentar maior alongamento entre os nós, proporcionando aumento no número de brotos por explante (PRAXEDES et al., 2001). Contudo, diversos trabalhos com multiplicação *in vitro* de diferentes cultivares de abacaxizeiro demonstram haver grande variação no número final de plantas produzidas, havendo necessidade de adequar protocolos de micropropagação para cada cultivar, sobretudo no que se refere à utilização de concentrações adequadas dos reguladores de crescimento (COSTA et al., 2007), bem como sacarose e luminosidade. Dessa forma, objetivou-se otimizar a multiplicação do abacaxizeiro cv. Vitória por meio da técnica do estiolamento *in vitro* com uso de sacarose, ácido giberélico e regeneração em diferentes tipos de luz e meios de cultivo.

Material e Métodos

Brotações de abacaxizeiro já estabelecidas *in vitro* foram desfolhadas completamente, restando apenas a porção basal com 1 cm, que foram transferidos para frascos contendo 30 mL do meio MS semissólido com os diferentes tratamentos os quais foram constituídos por concentrações de ácido giberélico (GA_3) (0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg L^{-1}) em combinação com sacarose (15, 30 e 45 g L^{-1}). O meio foi solidificado com ágar (6 g L^{-1}) e teve seu pH ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem a 121°C, pressão de 1,1 atm por 20 minutos e, em seguida as culturas foram incubadas no escuro a 25 ± 2°C, por dois meses. Após esse período, as plântulas foram avaliadas por meio do número de brotos, número de nós, número de raízes e comprimento da parte aérea. O experimento foi instalado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC),

em esquema fatorial 4x3, num total de 12 tratamentos com seis repetições composta por três explantes cada uma.

Após as avaliações, os brotos estiolados foram submetidos à regeneração. Para isso, o sistema radicular dos brotos estiolados foi removido e os segmentos caulinares colocados horizontalmente em frascos contendo 20 mL de meio MS líquido estacionário e MS semissólido (6 g L^{-1} de ágar), em condições de sala de crescimento (Luz artificial) e casa de vegetação (Luz natural), totalizando quatro tratamentos. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) e cada repetição constitui-se de um frasco contendo cinco segmentos caulinares estiolados e cada um contendo duas gemas. Aos 60 dias, foi avaliado o número de brotos regenerados a partir de cada segmento estiolado. Os brotos regenerados foram subcultivados para meio MS líquido de enraizamento e serão posteriormente, aclimatizados.

Resultados e Discussão

Apenas as características número de raízes e número de nós oriundos de explantes de abacaxizeiro cv. Vitória apresentaram significância para o fator ácido giberélico, após 60 dias de incubação em sala de crescimento. As demais variáveis (número de brotos e comprimento da parte aérea das plântulas) não foram significativas para os fatores estudados.

O número de raízes e o número de nós foram influenciados negativamente com a adição de ácido giberélico ao meio de cultura, proporcionando maiores resultados 1,27 e 5,95, respectivamente, em meio MS semissólido sem o regulador (Figuras 1A e 1B).

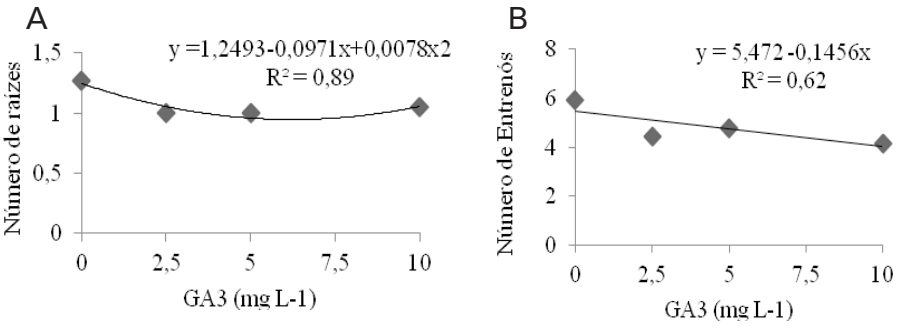

Figura 1. Número de raízes (A) e Número de Entrenós (B) oriundos de segmentos estiolados de abacaxizeiro cv. Vitória cultivados em diferentes concentrações de ácido giberélico (GA3).

Propagando segmentos estiolados de abacaxizeiro, Sá et al. (2000) registraram maiores médias para o número de brotos (6,0) em meio contendo 1,86 mg L^{-1} de ANA e de BAP.

Não houve significância para as variáveis número de brotos e comprimento da parte aérea, porém foram registrados maiores valores nos tratamentos T2 (MS + 30 g L^{-1} sacarose) e T3 (MS + 45 g L^{-1} sacarose), com médias de 2,10 brotos e 7,28 cm, respectivamente (Dados não apresentados). Já em meio MS padrão (T2), o valor registrado para comprimento da parte área foi 0,18 cm menor que o tratamento T3 e sem diferença significativa entre eles.

O comprimento dos brotos estiolados é uma variável importante, pois está diretamente relacionado com o número de nós que serão recuperados em novas brotações, quando colocados em condições de luz.

Na regeneração de plantas, não ocorreu significância para os fatores ambiente e consistência do meio de cultura para o número de brotos por nó, entretanto o número de brotos total foi significativo para os tratamentos analisados (Tabela 1).

Tabela 1. Número de brotos regenerados por nó (NBR/nó) e número de brotos regenerados por frasco (NBR/frasco) a partir de segmentos estiolados e cultivados em diferentes ambientes e consistência de meios de cultura.

	Vitória	
	NBR/nó	NBR/frasco
SC + L	2,59 a	12,33 a
SC + S	1,80 a	9,00 ab
CV + L	2,05 a	9,66 ab
CV + S	1,23 a	5,67 b

Médias seguidas de mesma letra, na vertical para os tratamentos, não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Melhor resultado de regeneração *in vitro* de brotos foi obtido em meio de cultura MS líquido e em frascos mantidos em sala de crescimento (Tabela 1). Segundo Kiss et al. (1995), a taxa de regeneração de mais de um broto por nó indica que foram formadas gemas adventícias.

Os brotos obtidos em meio sólido, independente do ambiente de cultivo, se apresentavam amarelados e com menor comprimento.

Entre os diversos componentes do ambiente, a luz é primordial para o crescimento das plantas, fornecendo sinais que regulam o desenvolvimento. Dessa forma, modificações nos níveis de irradiância podem condicionar diferentes respostas fisiológicas em suas características bioquímicas, anatômicas e de crescimento. Para Economou; Read (1987), a irradiância, além de influenciar o crescimento e a proliferação das brotações, pode afetar diretamente a formação de raízes e, quando em excesso, reduzir a formação das mesmas.

Conclusão

O método do estiolamento *in vitro* é viável para abacaxizeiro, sendo recomendado o meio MS contendo 30 g/L de sacarose para a cv. Vitória sem a presença do regulador de crescimento. A regeneração de plantas a partir de brotos estiolados é recomendada em meio MS líquido, sendo os frascos incubados em sala de crescimento (luz artificial).

Agradecimentos

Ao CNPq, à Fapitec-SE, ao Sergipetec e a Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Referências Bibliográficas

COSTA, F.H.S.; PEREIRA, M.A.A.; OLIVEIRA, J.P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, p. 41-46, 2007.

ECONOMOU, A.S.; READ, P.E. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. **HortScience**, Alexandria, v.22, n.5, p.751-754, 1987.
KISS E; KISS J; GYULAI G; HESZKY LE. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortScience**, Alexandria, v.30, p. 127-129, 1995.

PRAXEDES, S.C.; SILVA JR., A.F. da; FIGUEIREDO, F.L.B.; FIGUEIREDO, M. de L.; C˜MARA, F.A.A.; OLIVEIRA, O.F. de. Estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro Pérola em presença de ANA e AIA. **Caatinga**, Mossoró, v. 14, p. 13-15, 2001.

SÁ, M.E.L. de; PEREIRA, F.D.; BRAGA, M.F.; MUSTAFÁ,P.C.; ALVES, A.P. Propagação *in vitro* de abacaxi (*Ananas comosus*) por meio de segmentos estiolados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 16., 2000, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2000. p. 21.

III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas

Ambientes de Cultivo e Concentrações de Sacarose no Desenvolvimento *In Vitro* de Explantes de Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*).

Begna Janine da Silva Lima[1], Amanda T. B. de Araújo[2], Lucinalva A. dos Santos[3], Joel C. dos Santos[1], Núbia P. da Costa[4], Lenyneves D. A. de Araújo[4]

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar os diferentes ambientes de cultivo *in vitro* e concentrações de sacarose na formação de brotações em explantes de Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). Os experimentos de multiplicação foram conduzidos no Laboratório de Cultura de tecido do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal Paraíba e em um telado anexo ao laboratório. Foi utilizado o meio de cultura MS + 0,5 mg. L^{-1} de BAP (6-Benzilaminopurina), suplementado com 7 g L^{-1} de Agar, sendo o pH ajustado para 5,8. Foram testadas três concentrações de sacarose (0, 10, e 20 mg.L^{-1}) em três ambientes diferentes: Ambiente 1- Sala de Crescimento; Ambiente 2- Sala de Laboratório; Ambiente 3- Telado. Concluiu-se que a formação de brotações em explantes cultivados *in vitro* de Lisianthus é viável em sala de crescimento.

Palavras-chave: ornamental, micropropagação, cultivo fotoautotrófico.

[1] Graduando(a) em Agronomia, bolsista PET-Conexões de Saberes CCA/UFPB, begna.agro@gmail.com e agronomojoel@gmail.com.
[2] Graduanda em Agronomia, bolsista PIVIC – CCA/UFPB, amandatomaz_@hotmail.com.
[3] Graduanda em Biologia - CCA/UFPB, nalvinha.cat@hotmail.com.
[4] Bióloga, mestre em Biologia Vegetal, professora da Universidade Federal da Paraíba, (UFPB), núbia@cca.ufpb.br.

Introdução

O lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) é uma ornamental, pertencente à família das Gentianaceae, que foi introduzido no Brasil no final da década de 80 e começou a se destacar economicamente a partir da década de 90, despertando interesse de produtores e consumidores devido às suas belas flores (SALVADOR, 2000; CAMARGO et al., 2004).

A propagação *in vitro* é uma técnica bem sucedida e tem sido bastante utilizada, principalmente, com plantas ornamentais com muitas vantagens sobre os métodos convencionais de propagação, permitindo a obtenção em curto espaço de tempo de um grande número de plantas de boa qualidade fitossanitária com fidelidade varietal, como também, a aquisição de mudas em qualquer época do ano (FRÁGUAS et al., 2002). A técnica viabiliza a clonagem de várias espécies, permitindo a formação de indivíduos geneticamente idênticos a partir de células, órgãos ou pequenos fragmentos de uma planta (SOUZA; JUNGHANS, 2006). No processo de cultivo *in vitro* tradicional, em salas de crescimento, os cultivos se desenvolvem, geralmente, com o fornecimento de luz diário de 16h e em temperatura em torno de 25 ºC, mantidos por luz artificial e ar-condicionado. Atualmente, vêm se buscando alternativas a essas condições com a substituição das salas totalmente climatizadas por condições ambientais, tais como: uso de luz natural e temperatura ambiente no cultivo *in vitro.* Estas alternativas já foram testadas com sucesso para algumas ornamentais, como crisântemos e orquídeas (DIGNART et al., 2005). Nesse aspecto, este trabalho teve como objetivo avaliar os diferentes ambientes de cultivo *in vitro* e concentrações de sacarose na formação de brotações em explantes de Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*).

Material e Métodos

Os experimentos de multiplicação *in vitro* do Lisianthus (*Estouma grandiflorum*) foram conduzidos no Laboratório de Cultura de tecidos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal Paraíba (UFPB) e em um telado anexo ao

laboratório. Utilizou-se 3 plantas matrizes adultas de Lisianthus produzidas a partir de sementes, cedidas pela Associação de Desenvolvimento Sustentável de Macacos e Furnas (ADESMAF, Areia PB). Dessas plantas foram retiradas 9 folhas medianas que foram utilizadas como fonte de explantes. Visando evitar possíveis variações, todos os tratamentos receberam folhas das mesmas plantas. As folhas passaram por um processo de lavagem em água corrente e desinfestadas em álcool 70% por um minuto e hipoclorito de sódio 20% (v/v), submetidas à agitação mecânica por 20 minutos. Após a descontaminação, as folhas foram enxaguadas em capela de fluxo laminar, com água destilada autoclavada, seguida de três lavagens sucessivas, para remoção do resíduo das soluções desinfetantes.

Uma vez desinfestadas, as folhas foram cortadas em segmentos de aproximadamente 1 cm^2 e inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) + 0,5 mg. L^{-1} de BAP (6-Benzilaminopurina), suplementado com 7 g L^{-1} de Agar, sendo o pH ajustado para 5,8 e sacarose nas concentrações de 0, 10, e 20 $mg.L^{-1}$. Posteriormente, os tubos foram vedados com papel alumínio e dispostos em sala de cultivo com diferentes ambientes compondo os tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 3x3 (ambiente x sacarose) totalizando 9 tratamentos com 10 repetições cada. Os dados foram submetidos a análise estatística de variância, com níveis de significância de 1% a 5%. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o software estatístico (SAS 9.0).

Os tratamentos formados por diferentes ambientes foram assim distribuídos:

Ambiente 1- Sala de Crescimento: Sala iluminada com luz artificial 35 micro $mol/m^2/s$, distanciadas em 15 cm, com fotoperíodo de 16 horas de luz controlada por timer programador manual e temperatura média de 25°C ±1°C mantida por ar- condicionado.

Ambiente 2- Sala de Laboratório: Sala iluminada com luz natural, incidente através da janela de vidro e temperatura ambiente. Temperatura média de 26,86 ºC ± 5ºC e Umidade relativa média de 89,36% ± 5%.

Ambiente 3- Telado: Telado com cobertura plástica de 100 micra e sombrite 50% com temperatura ambiente. Temperatura média de 27,18 ºC± 5ºC e Umidade relativa média de 80,55% ± 5%.

As avaliações dos explantes que emitiram brotações foram realizadas aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação dos explantes no meio de cultura. Explantes que não brotaram e os que morreram foram descartados. Os que brotaram foram identificados e transferidos para o meio MS sem regulador de crescimento e mantidas as concentrações iniciais de sacarose e nos mesmos ambientes que constituíram os tratamentos.

Resultados e Discussão

O percentual médio de explantes de Lisianthus que emitiram brotações é apresentado na Tabela 1. Verifica-se que nas condições de cultivo da Sala de Crescimento, a ausência de sacarose inibiu a formação de brotações nos explantes. Na condição da Sala de Laboratório, ambiente 2, a concentração de 10 $mg.L^{-1}$ de sacarose propiciou formação de brotos em torno de 28% dos explantes não diferindo estatisticamente da concentração de 20 $mg.L^{-1}$. Quando se avalia os diferentes ambientes, a ausência de sacarose levou a formação de brotação em explantes dos ambientes 2 e 3, Sala de Laboratório e Telado, respectivamente, o que sugere que as condições nesses dois ambientes favoreceram o início do desenvolvimento fotoautotrófico dos explantes. Verifica-se que na concentração de 10 $mg.L^{-1}$ de sacarose, o ambiente 2- Sala de Laboratório resultou em formação de brotações que não diferiu estatisticamente da Sala de Crescimento, ambiente 1. Na concentração de 20 $mg.L^{-1}$ de sacarose em todos os ambientes não houve diferença estatística entre si. Esses resultados são similares aos encontrados por Agra et al. (2009) que estudando a influência de ambientes e concentrações de sacarose na micropropagação de violeta

africana em diferentes tempos de cultivo concluíram que as concentrações de 10 e 20 mg L^{-1} de sacarose possibilitaram um bom desenvolvimento de brotações, em sala de crescimento e em sala com luz artificial e temperatura ambiente. Segundo KODYM; ZAPATA-ARIAS (1999) a utilização de luz natural apresenta várias vantagens, como a eliminação dos gastos com luz artificial, redução dos custos de manutenção, instalações simplificadas, diminuindo os custos com construção e, durante a aclimatização o estresse causado à planta é menos intenso.

Tabela 1. Número de brotos regenerados por nó (NBR/nó) e número de brotos regenerados por frasco (NBR/frasco) a partir de segmentos estiolados e cultivados em diferentes ambientes e consistência de meios de cultura.

Sacarose (mg.L^{-1})	Ambientes		
	1	2	3
0	0a B	0.16aB	0.16a B
10	40 aA	28.8 abA	16 b A
20	27.5 abA	8.8 bB	18 ab A

- Ambiente 1- Sala de Crescimento; Ambiente 2- Sala de Laboratório; Ambiente 3- Telado.
- Médias seguidas de letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, são iguais entre si pelo teste de Tukey.

Conclusão

A formação de brotações em explantes cultivados *in vitro* de Lisianthus é viável em ambientes diferentes da Sala de Crescimento.

Referências Bibliográficas

AGRA, P.F.M; SANTOS, M.S; BARROS, H.M.M; COSTA, C.M.G.R; COSTA, N.P; PERAZZO NETO, A. Influência de ambientes e concentrações de sacarose na micropropagação de violeta africana em diferentes tempos de cultivo. **Tecnologia & Ciência Agropecuária** [online], João Pessoa, v. 3, n. 3, p. 73-76,

set. 2009.

CAMARGO, M.S.; SHIMIZU, L.K.; SAITO, M.A.; KAMEOKA, C.H.; MELLO, S.C.; CARMELLO, Q.A.C. Crescimento e absorção de nutrientes pelo lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) cultivado em solo. **Horticultura Brasileira**, v.22, p.143-146, 2004.

DIGNART, S.L.; CASTRO, E.M.; BRAGA, F.T.;PASQUAL, M. Cultivo in vitro de cattleia walkeriana Gardn (Orcchidaceae) em casa de vegetação. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.2, p.616, ago. 2005. (Suplemento).

FRÁGUAS, C.B.; PASQUAL, M.; DUTRA, L.F.;CHAGAS, E.A. Desenvolvimento in vitro de plântulas de bromélias: sacarose e concentrações do meio MS. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.7, n.2, p.55-63, 2002.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.55, p.141-145, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid grow and biossays with te bacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagem, v.15, p.473-97, 1962.

SALVADOR, E.D. **Caracterização física e formulação de substratos para o cultivo de algumas ornamentais**. 2000. 148p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152 p

Estudo da Conservação *in vitro* por Crescimento Lento em Coqueiro-anão

Caroline de Araujo Machado[1], Catrine Regina Feitosa Moura[1], Ana da Silva Lédo[2], Semiramis R. R. Ramos[3], Francisco Elias Ribeiro[4]

Resumo

O estudo da conservação do coqueiro tem sido alvo de estudos nos últimos anos por organizações de pesquisa pública e privada. Essas pesquisas têm se concentrado na obtenção de protocolos de conservação *in vitro* utilizando reguladores osmóticos e de crescimento. O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito do ácido abscísico no crescimento de plântulas de acessos de coqueiro-anão para fins de conservação. Foram utilizados embriões zigóticos maduros de acessos de coqueiro-anão vermelho-do-Gramame (AVG). com 11-12 meses, provenientes de plantas com sete anos de idade do BAG da Embrapa Tabuleiros Costeiros, no Campo Experimental de Itaporanga, em Itaporanga d'Ajuda, Sergipe. Para avaliação do efeito do manitol na germinação e crescimento de plântulas de coqueiro, os embriões foram inoculados em meio de cultura Y3 suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, gelificado com 0,7% de ágar na presença de 2,5 g L^{-1} de carvão ativado. Foram testadas as seguintes concentrações de manitol: 0; 10; 20; 30 e 40 μM. Aos 180 e 270 não houve redução do crescimento de plântulas para o acesso AVG.

Palavras-chave: *Cocos nucifera* L., cultura de tecidos, germoplasma, ácido abscísico.

[1] Graduandas da Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE, camachado1@hotmail.com, catrinemoura@hotmail.com.
[2] Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.ledo@embrapa.br.
[3] Engenheira-agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, semiramis.ramos@cpatc.embrapa.br.
[4] Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, elias.ribeiro@cpatc.embrapa.br.

Introdução

A introdução do coqueiro-anão (variedade Nana) aconteceu no Brasil de forma segmentada e em regiões diferentes. A cultura do coqueiro está difundida em 90 regiões intertropicais do globo terrestre e, segundo dados da FAO, em 2009 a Indonésia foi o maior produtor mundial com 19.500.000 toneladas, seguido por Filipinas e Índia com 15.319.500 e 10.894.000 toneladas, respectivamente.

Entre as técnicas biotecnológicas a cultura de tecidos apresenta-se como uma das de maior êxito, e inclui métodos de propagação e conservação de germoplasma. A manutenção de coleções *in vitro* vem sendo considerada como um método alternativo e complementar à conservação de germoplasma no campo, principalmente para as espécies propagadas vegetativamente e aquelas que são recalcitrantes, ou seja, podem ter suas sementes conservadas a baixas temperaturas e umidade.

A conservação de plantas *in vitro* se baseia no cultivo das coleções em laboratório, a partir da técnica de cultura de tecidos (GEORGE, 1993). O objetivo deste trabalho foi de estudar o efeito do ácido abscísico no crescimento de plântulas de acessos de coqueiro-anão para fins de conservação.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, localizado na Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju - SE. Foram utilizados embriões zigóticos maduros do acesso de coqueiro-anão-vermelho-de-Gramame (AVG) com 11-12 meses, provenientes de plantas com sete anos de idade do BAG da Embrapa Tabuleiros Costeiros, do Campo Experimental de Itaporanga, em Itaporanga d'Ajuda, Sergipe. Em condições assépticas, os embriões excisados das seções de endosperma, foram imersos em álcool etílico a 70%, por dois minutos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio comercial 2-2,5% por 20 minutos, sob agitação e, posteriormente, lavados três vezes

em água destilada estéril. os embriões foram inoculados em meio de cultura Y3 (EEUWENS, 1976) suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, geleificado com 0,7% de ágar na presença de 2,5 g L^{-1} de carvão ativado. Foram testadas as seguintes concentrações de ácido abscísico: 0; 10; 20; 30 e 40μM. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121°C e 1,0 atmosfera por 15 minutos). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura variando de 25°C ± 2, umidade relativa do ar média em torno de 70%, na ausência de luz até a indução da parte aérea e, em seguida, foram transferidas para fotoperíodo de 12 horas. Aos 180 e 270 dias de cultivo foram avaliados o comprimento da parte aérea e comprimento da raiz primária das plântulas. Foi instalado um ensaio no delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco concentrações de ácido abscísico e cinco repetições. Totalizando 500 embriões zigóticos, sendo 250 embriões de cada acesso. As médias foram submetidas à análise da variância pelo teste F e ajustadas equações de regressão polinomial, utilizando o programa SISVAR (FERREIRA et al., 2011).

Resultados e Discussão

Avaliando o comprimento da parte aérea para o acesso AVG aos 180 dias de cultivo *in vitro* foi possível observar que não houve diferença significativa entre as concentrações de ABA. O ABA nas concentrações avaliadas promoveu uma pequena redução no crescimento da parte aérea.

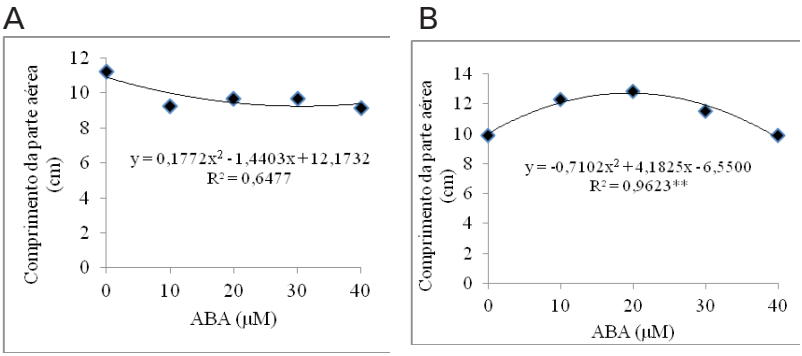

Figura 1. Comprimento da parte aérea de plântulas do acesso AVG em função da concentração de manitol aos 180 (A) e 270 (B) dias de cultivo *in vitro.*

O principal papel do ácido abscísico é controlar o início e a manutenção da dormência de sementes e de gemas e as respostas do vegetal ao estresse, em particular ao estresse hídrico. Os vários efeitos do ABA na cultura de tecidos de plantas sugerem que este pode modificar a síntese ou atividade das citocininas (LEMOS, 2000). O mesmo autor relata que embriões zigóticos próximos à maturação apresentaram seu crescimento paralisado na presença de 26,4 mg L^{-1} de ABA e permaneceram viáveis (LEMOS, 2000).

Os resultados sugerem estudos posteriores para avaliação do efeito de concentrações mais elevadas de ABA na redução do crescimento dos acessos AVG e AAM.

Conclusão

As concentrações de ABA não apresentaram efeito na redução do crescimento de plântulas para o acesso AVG.

Agradecimentos

A Embrapa Tabuleiros Costeiros e COGENT pelo apoio financeiro. A FAPITEC-SE e a CAPES pela concessão de bolsa.

Referências Bibliográficas

EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation os tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, v.36, p.23-28, 1976.

FAOLE, M.; HARRIES, H. Farm and forestry production and markenting profile for coconut (*Cocos nucifera*). In: ELEVITH, C.R. (Ed.) **Specialty crops for pacific island agroforestry**. Holualoa: Permanent Agriculture Resources (PAR), 248p., 2009.

FERREIRA, D.F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia,** v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. London: Exegetics**,** v.1, 1993. 574p.

LEMOS, E.E.P. de. Ácido abscísico. In: CID, L.P.B (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v.1, p.159-180, 2000.

Efeito do Manitol na Conservação *in vitro* de Coqueiro-anão

Caroline de Araujo Machado[1], Catrine Regina Feitosa Moura[1], Ana da Silva Lédo[2], Semiramis R. R. Ramos[3], Francisco Elias Ribeiro[4]

Resumo

A conservação do coqueiro tem sido alvo de estudos nos últimos anos por organizações de pesquisa pública e privada. Essas pesquisas têm se concentrado na obtenção de protocolos de conservação *in vitro* utilizando reguladores osmóticos e de crescimento. O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito do manitol no crescimento de plântulas de acessos de coqueiro-anão para fins de conservação. Foram utilizados embriões zigóticos maduros de acessos de coqueiro-anão: anão-vermelho-de-Gramame (AVG). com 11-12 meses, provenientes de plantas com sete anos de idade do BAG da Embrapa Tabuleiros Costeiros, do Campo Experimental de Itaporanga, em Itaporanga d'Ajuda, Sergipe. Para avaliação do efeito do manitol na germinação e crescimento de plântulas de coqueiro, os embriões foram inoculados em meio de cultura Y3 suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, gelificado com 0,7% de ágar na presença de 2,5 g L^{-1} de carvão ativado. Foram testadas as seguintes concentrações de manitol: 0; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 M. Aos 180 e 270 dias o comprimento da parte aérea e comprimento da raiz primária das plântulas. Concentrações de 0,1 e 0,2 M de

[1] Graduandas da Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE, camachado1@hotmail.com, catrinemoura@hotmail.com.
[2] Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.ledo@embrapa.br.
[3] Engenheira-agrônoma, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, semiramis.ramos@cpatc.embrapa.br.
[4] Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, elias.ribeiro@cpatc.embrapa.br.

manitol para o acesso AVG aos 180 e 270 dias de cultivo foram suficientes para reduzir o comprimento da parte aerea.

Palavras-chave: *Cocos nucifera* L., cultura de tecidos, germoplasma, regulador osmótico.

Introdução

O coqueiro é uma palmeira tropical que se encontra distribuída mundialmente em mais de 90 países. É considerada como uma das plantas de maior utilidade ao homem, pois é capaz de gerar um sistema auto-sustentável de exploração, proporcionando emprego e renda, além de servir como fonte básica da alimentação em vários países asiáticos. Além da sua importância paisagística, toda a planta pode ser aproveitada, desde a raiz ao fruto, gerando mais de 100 produtos ou subprodutos (BENASSI et al., 2007).

A região Nordeste representa 82,28% do total da área plantada de coco e, 69,25% do valor total do coco produzido do Brasil, tendo o Município de Conde, na Bahia, como maior representante, correspondendo a 6,19% do total plantado e 9,0% do coco produzido no Nordeste (MARTINS; JESUS JUNIOR, 2011). A conservação de plantas *in vitro* se baseia no cultivo das coleções em laboratório, a partir da técnica de cultura de tecidos (GEORGE, 1993). Nestas condições, a conservação de germoplasma *in vitro* pode ser feita a partir de mudanças no ambiente de cultivo para desacelerar ou suprimir totalmente o crescimento de células, tecidos e órgãos por meio da criopreservação. Na redução do metabolismo das plantas, têm-se utilizado como estratégia, modificações nas condições físicas (temperatura, luz e umidade) ou químicas do meio de cultivo (nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores osmóticos ou inibidores de crescimento) (WITHERS; WILLIAMS, 1998). O objetivo deste trabalho foi de estudar o efeito do manitol no crescimento de plântulas de acessos de coqueiro-anão para fins de conservação.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, localizado na Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju - SE. Foram utilizados embriões zigóticos maduros do acesso de coqueiro-anão-vermelho-de-Gramame (AVG) com 11-12 meses, provenientes de plantas com sete anos de idade do BAG da Embrapa Tabuleiros Costeiros, do Campo Experimental de Itaporanga, em Itaporanga d'Ajuda, Sergipe. Em condições assépticas, os embriões excisados das seções de endosperma, foram imersos em álcool etílico a 70%, por dois minutos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio comercial 2-2,5% por 20 minutos, sob agitação e, posteriormente, lavados três vezes em água destilada estéril. os embriões foram inoculados em meio de cultura Y3 (EEUWENS, 1976) suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, geleificado com 0,7% de ágar na presença de 2,5 g L^{-1} de carvão ativado. Foram testadas as seguintes concentrações de manitol: 0; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 M. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (121°C e 1,0 atmosfera por 15 minutos). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura variando de 25°C ± 2, umidade relativa do ar média em torno de 70%, na ausência de luz até a indução da parte aérea e, em seguida, foram transferidas para fotoperíodo de 12 horas. Aos 180 e 270 dias de cultivo foram avaliados o comprimento da parte aérea e comprimento da raiz primária das plântulas. Foi instalado um ensaio no delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco concentrações manitol e cinco repetições. Totalizando 500 embriões zigóticos, sendo 250 embriões de cada acesso. As médias foram submetidas à análise da variância pelo teste F e ajustadas equações de regressão polinomial, utilizando o programa SISVAR (FERREIRA et al., 2011).

Resultados e Discussão

Houve efeito significativo do manitol na redução do crescimento da parte aérea de plântulas do acesso AVG para o crescimento da parte aérea aos 180 e 270 dias de cultivo *in vitro.* O comprimento da parte aérea do acesso AVG apresentou

comportamento quadrático em relação às concentrações de manitol aos 180 e 270 dias de cultivo sendo evidente o seu efeito inibidor do crescimento a partir de 0,2 M com efeito deletério na concentração de 0,4 M.

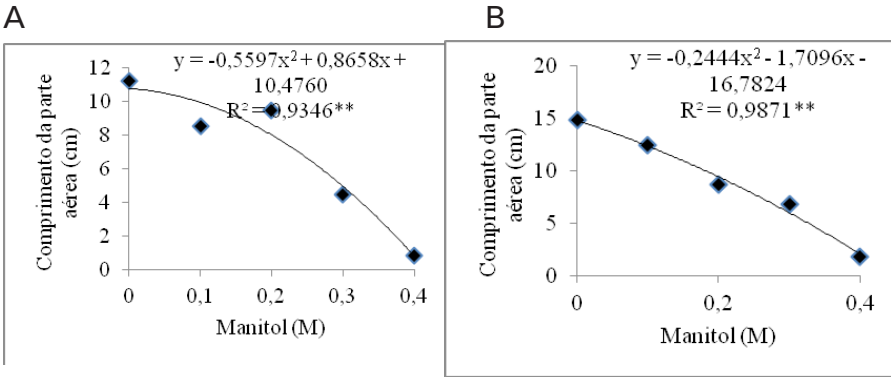

Figura 1. Comprimento da parte aérea de plântulas do acesso AVG em função da concentração de manitol aos 180 (A) e 270 (B) dias de cultivo *in vitro*.

Em estudo realizado por Damasco (2002), o manitol também apresentou efeito inibitório particularmente na concentração de 0,3M nas variedades *Tall Laguna* (LAGT), *Tall Takapuno* (TAGT) e *Malasyan Yellow Dwarf* (MYD). Sá et al. (2011), avaliando o efeito do manitol em microestacas de mangabeira concluíram que as concentrações de 10, 15 e 20g L^{-1} não foram viáveis para a conservação *in vitro*, uma vez que apresentaram efeito tóxico. Santos et al. (2011) relatam que a presença de 10 ou 20 g L^{-1} de sorbitol em meio MS promove a redução do crescimento em segmentos nodais de mangabeira aos 120 dias de cultivo *in vitro*.

Conclusão

A adição de diferentes concentrações do regulador osmótico manitol, reduziu o crescimento da parte aérea para o acesso AVG em relação ao controle, podendo ser promissor para a conservação *in vitro* por crescimento lento.

Agradecimentos

A Embrapa Tabuleiros Costeiros e COGENT pelo apoio financeiro . A FAPITEC-SE e a CAPES pela concessão de bolsa.

Referências Bibliográficas

BENASSI, A.C.; RUGGIERO, C.; MARTINS, A.B.G.; SILVA, A.A. Caracterização biométrica de frutos de coqueiro, *Cocos nucifera* L. variedade anã-verde, em diferentes estádios de desenvolvimento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.9, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452007000200022&script=sci_arttext> Acesso em: 12 out 2011.

EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation os tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, v.36, p.23-28, 1976.

FERREIRA, D.F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia,** v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. London: Exegetics**,** v.1, 1993. 574p.

MARTINS, C.A.; JESUS JUNIOR, L.A. de. Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional: panorama 2010. Embrapa Tabuleiros Costeiros, p.7-14, 2011. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, 164). Disponível em <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2011/doc_164.pdf> Acesso em: 30 jan 2012.

SÁ, A.J.; LÉDO, A.S.; LÉDO, C.A.S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v.41, n.1, p.57-62, 2011.

WITHERS, L.A; WILLIAMS, J.T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa - CNPH, v.1, p. 297-330, 1998.

III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas

Ácido Giberélico na Cultura de Embriões Zigóticos de Coqueiro-anão-verde

José Edmário dos Santos[1], Ana da S. Lédo[2], Caroline de A. Machado[3], Aparecida G. de Araujo[4], Zilna B. de R. Quirino[5], Jaci L. Vilanova-Neta[6], Milena M. de J. Ribeiro[7], Camila S. Almeida[8]

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito do ácido giberélico (GA_3) no cultivo *in vitro* de embriões zigóticos do coqueiro-anão-verde-do-Brasil-de-Jequi (AVeBrJ). Em condições assépticas, embriões foram excisados dos discos de endosperma e imersos em álcool etílico a 70% por dois minutos, em seguida, em solução de hipoclorito comercial por 20 minutos sob agitação e, submetidos à tripla lavagem em água estéril. Os embriões foram inoculados em frascos contendo 30 mL de meio de cultura Y3 sólido, com 60 g/L de sacarose suplementado com diferentes concentrações de GA_3 (0; 0,5; 1; 1,5 e 2 μM) na germinação *in vitro* do coqueiro AVeBrJ. O desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui (AVeBrJ) é favorável na concentração de 1,3 μM de

[1] Graduando em Licenciatura Química, Bolsista FAPITEC/PIBITI, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, edmario_jeds@hotmail.com.
[2] Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, ana.ledo@embrapa.br.
[3] Bióloga, Mestre em Agroecossistemas, São Cristovão, SE, caroline_machado866@hotmail.com.
[4] Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe (Emdagro), Aracaju, SE, agaraujo2003@hotmail.com.
[5] Engenheira-agrônoma, mestre em Agroecossitemas, zilna_br@hotmail.com.
[6] Mestranda, Universidade Tiradentes, jaci_vilanova@yahoo.com.br.
[7] Graduanda em Engenharia Florestal, bolsista da Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe (Emdagro), São Cristovão, SE, milenarjm@gmail.com.
[8] Engenheira-agrônoma, mestranda em Biotecnologia, Bolsista da Universidade Federal de Sergipe (UFS) São Cristovão, SE, kmilinhafsa@hotmail.com.

ácido giberélico. Embriões com 60 dias de germinação apresentaram índices eficientes na formação de haustório e parte aérea.

Palavras-chave: *Cocos nucifera* L.; coqueiro-anão-verde-do-Brasil-de-Jequi; embriões zigóticos.

Introdução

O coqueiro pertence à família Arecaceae, gênero *Cocos* e a espécie *Cocos nucifera* L. Sendo essa dividida em duas variedades principais: a Typic (coqueiro-gigante) e a Nana (coqueiro-anão que pode ser: verde, amarela e vermelha). É uma planta de grande importância socioeconômica para as regiões litorâneas do Nordeste do Brasil devido a sua fácil adaptação a essas condições ambientais e por ser uma planta de produção contínua, gerando emprego durante todo o ano.

A cultura de embriões tem sido utilizada para coleta e intercâmbio de germoplasma de coqueiro, porque suas sementes apresentam grandes dimensões, o que aumenta drasticamente o volume de material a ser coletado e conservado (ENGELMANN; BATUGAL, 2002). Técnicas *in vitro* simples e eficientes têm sido estabelecidas por vários grupos de pesquisa em diversos países. Entretanto, a aplicação destas requer o estabelecimento de protocolos eficientes de germinação e desenvolvimento in vitro de embriões e aclimatação em condições in vivo, para o desenvolvimento de plantas adaptadas às condições de campo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido giberélico na cultura in vitro de embriões zigóticos de coqueiro anão verde do Brasil de Jiqui (AVeBrJ).

Material e Métodos

Embriões zigóticos oriundos de frutos maduros de plantas matrizes do banco ativo de germoplasma de coco da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado em Itaporanga d´Ajuda, Sergipe, foram excisados a partir de discos de endosperma. Em condições assépticas, os embriões foram imersos em álcool etílico a 70%

por dois minutos, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (2%) por 20 minutos sob agitação e, submetidos à tripla lavagem em água destilada estéril.

Após assepsia, os embriões foram inoculados em frascos contendo 30 mL de meio Y3 (EEUWENS, 1976) com 60 g/L de sacarose e 0,8% de ágar e acrescidos de cinco concentrações de GA_3 (0; 0,5; 1; 1,5 e 2 μM). O pH do meio foi ajustado para 5,8 e, em seguida, submetido à esterilização em autoclave a 121ºC e pressão de 1 atm. As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 2ºC, 12 horas de luz sob 52 μmol/m^2/s de irradiação.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, com quatro repetições, sendo cada parcela representada por cinco frascos com um embrião cada.

Após 30 e 60 dias após a inoculação foram avaliados: formação de haustório, parte aérea e presença de raiz. As médias das variáveis foram submetidas à análise de variância, a 5% de probabilidade no programa estatístico Sisvar.

Resultados e Discussão

Para a variável formação de raízes os tratamentos não apresentaram diferença significativa, entretanto, para as variáveis, formação de haustório e de parte aérea os fatores apresentaram significância separadamente.

Para formação de parte aérea e haustório os melhores resultados foram obtidos na concentração 1,3 μM de ácido giberélico (GA_3) com 87,2% e 52,32%, respectivamente (Figuras 1A e 1B). Para o período de germinação, a melhor porcentagem na formação de haustório (83,7%) e parte aérea (60%) foram observadas aos 60 dias de germinação *in vitro* (Tabela 1).

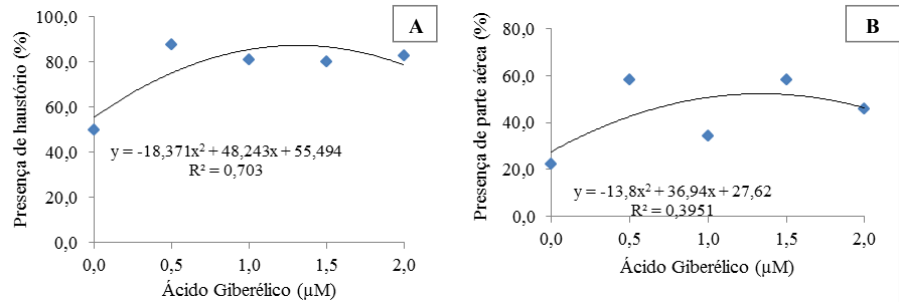

Figura 1. A- Porcentagem de plantas com haustório e B- Porcentagem de plantas com parte aérea oriundas de embriões germinados *in vitro*, em meio de cultura Y3 adicionado de diferentes concentrações de ácido giberélico.

Tabela 1. Porcentagem de plantas com haustório e parte aérea oriundas de embriões germinados *in vitro* em meio de cultura Y3 cultivados em diferentes períodos de germinação.

Período de germinação	Formação de haustório (%)	Formação de Parte aérea (%)
30 dias	68,7 b	27,7 b
60 dias	83,7 a	60,0 a
CV (%)	28,87	46,27

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na vertical, não diferem entre si, pelo Teste F, a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram observados por Barin (2011), constatando que a presença de GA_3 favorece a formação de parte aérea do coqueiro Gigante do Brasil Praia do Forte. Segundo Mantovani (2001), na regeneração *in vitro* de louro-pardo, onde a presença de GA_3 no meio de cultura favoreceu o desenvolvimento dos eixos caulinares e das folhas, o que tornou mais fácil a individualização, aproveitamento e contagem das brotações de louro-pardo. Figueiredo et al. (2001) relatam a necessidade do GA_3 para o alongamento das brotações de *Rollinia mucosa*.

Conclusões

O desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de coqueiro-anão-verde-do-Brasil-de-Jequi (AVeBrJ) é favorável na concentração de 1,3 μM de ácido giberélico.

Embriões com 60 dias de germinação apresentaram índices eficientes na formação de haustório e parte aérea.

Referências Bibliográficas

BARIN, L.B. **Aprimoramento do protocolo de cultura *in vitro* de embriões zigóticos de acessos de coqueiro.** Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Sergipe: São Cristovão-SE, 2011.

EEUWENS, C.J. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum,** v.36, p.23-28, 1976.

ENGELMANN, F.; BATUGAL, P.A. Background on the development and implementation of the coconut embryo in vitro culture project. In: ENGELMANN, F.; BATUGAL, P.A.; OLIVER, J. (Ed.). **Coconut embryo in vitro culture**. Malaysia: IPGRI-APO, v.2. p.1-4, 2002.

FIGUEIREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA,V. R. C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill**. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant,** Wallingford, v. 37, p. 471-475, 2001.

MANTOVANI. N.C; FRANCO. E.T.H; VESTENA.S. REGENERAÇÃO IN VITRO DE LOURO-PARDO (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal,** Santa Maria, v. 11, p. 93-101, 2001.

Conservação *in vitro* de dois Genótipos de *Lippia Alba* (Mill E. N. Br)

Ítala Tainy Barreto Francisco dos Santos[1], Magna Galvão Peixoto[2],Rafaela Santos de Moura[3], Maria Clézia dos Santos[1], Jefferson Henrique Santos Silva[1], Rosana Barroso Feitosa[3], Maria de Fátima Arrigoni-Blank[4], Arie Fitzgerald Blank[5]

Resumo

Originária da América do Sul a *Lippia alba* (Mill.)N. E. Brown é uma planta medicinal, pertencente à família Verbenaceae e de grande importância terapêutica. Sendo muito utilizada pela população contra dores abdominais, afecções hepáticas dentre outras, e consumida principalmente na forma de chás produzido a partir de suas folhas. A concentração e os tipos de reguladores crescimento acrescidos ao meio de cultura determinam o amplo sucesso da pesquisa na cultura de tecidos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de conservação *in vitro* para dois genótipos de *L. alba* (LA-13 e LA-57). O ensaio de conservação foi implantado em DIC (delineamento inteiramente casualizado) com esquema fatorial 4x2x2 totalizando assim dezesseis tratamentos, sendo quatro reguladores osmóticos (30 $g.L^{-1}$ de sacarose; 20 $g.L^{-1}$ de sacarose; 10 $g.L^{-1}$ de sacarose + 5 $g.L^{-1}$ de manitol; 10 $g.L^{-1}$ de sacarose + 5 $g.L^{-1}$ de sorbitol), duas

[1] Bolsistas de iniciação científica da Universidade Federal de Sergipe (UFS), Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal, São Cristóvão, SE, ítala.ufs@hotmail.com/kleezinha.sa@gmail.com/eng.jeffhenrique@gmail.com.

[2] Doutoranda em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal, São Cristóvão, SE, magnagp@yahoo.com.br.

[3] Mestranda em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal, São Cristóvão, SE, rosana.barroso@hotmail.com/rafaela-smoura@hotmail.com.

[4] Bióloga, doutora em Química e Biotecnologia, professor da Universidade Federal de Sergipe (UFS), Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal, São Cristóvão, SE, fatima.blank@gmail.com.

[5] Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, professor da Universidade Federal de Sergipe (UFS), Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal, São Cristóvão, SE, arie.blank@gmail.com.

temperaturas (15°C e 25°C) e dois genótipos (LA-13 e LA-57). As avaliações foram realizadas após três e seis meses de cultivo com parâmetros de notas para sobrevivência (%), coloração e comprimento de parte aérea dos explantes. De acordo com os resultadosverificou-se que é possível conservar por 3 meses a 15°C os dois genótipos (LA-13 e LA-57) utilizando 20 $g.L^{-1}$ de sacarose.

Palavras-chave: conservação, reguladores osmóticos, crescimento lento.

Introdução

A erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown] é considerada uma das plantas de real importância farmacológica, com atual utilização nos programas de fitoterapia. A espécie é largamente utilizada no Brasil devido às propriedades calmante, espasmolítica suave, analgésica, sedativa, ansiolítica e levemente expectorante (MATTOS et al., 2007). Pertencente à família Verbenaceae trata-se de um subarbusto de morfologia variável, alcançando medidas de até dois metros de altura, com ramos finos de coloração esbranquiçada, exibindo folhas de largura variável, com bordos serrados e ápice agudo (MATOS, 2000).

A estratégia de conservar plantas medicinais sob condições *in vitro* é uma alternativa viável, no sentido de proteger a biodiversidade brasileira, e também uma forma de disponibilizar germoplasma dessas espécies que constituem uma fonte de matéria prima importante para o desenvolvimento da indústria de fitoterápicos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de conservação *in vitro* para dois genótipos de erva cidreira brasileira.

Material e Métodos

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal do Departamento de Engenharia Agronômica da Universidade Federal de Sergipe. Foram utilizados segmentos nodais de plantas já estabelecidas *in vitro*, as quais foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura suplementado com os tratamentos dos ensaios. O

delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x2x2, sendo quatro reguladores osmóticos (30 g.L^{-1} de sacarose; 20 g.L^{-1} de sacarose; 10 g.L^{-1} de sacarose + 5 g.L^{-1} de manitol; 10 g.L^{-1} de sacarose + 5 g.L^{-1}de sorbitol), duas temperaturas (15°C e 25°C) e dois genótipos (LA-13 e LA-57). Cada tratamento com cinco repetições, sendo cada parcela representada por seis tubos contendo um segmento nodal. Cada tratamento com cinco repetições, sendo cada parcela representada por seis tubos contendo um segmento nodal. Após 90 e 180 dias de cultivo foram avaliados três variáveis: sobrevivência (%), coloração dos explantes a partir de uma escala de notas: 1 = folhas verdes; 2 = folhas verde-pálido; 3 = início do secamento das folhas; 4 = entre 30 e 50% de folhas mortas; 5 = mais de 50% de folhas mortas e 6 = folhas totalmente mortas (adaptado de Lemos et al, 2002), e comprimento de parte aérea: 1= até 2,0 cm; 2= 2,1-4,0 cm; 3= 4,1-6,0 cm; 4= 6,1-8,0 cm; 5= 8,1-10 cm e 6= maior que 10,0 cm. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Na análise de sobrevivência houve interação entre os genótipos, temperatura e reguladores osmóticos aos 90 dias de conservação *in vitro*. As melhores médias para ambos os genótipos foram apresentadas nos tratamentos com 30 e 20 g.L^{-1} de sacarose a 15°C e no tratamento com 30 g.L^{-1} de sacarose a 25°C (Tabela 1). Possivelmente por não promover a absorção de água e nutrientes, a adição de manitol e sorbitol no meio de cultura podem ter interferido na sobrevivência dos explantes, provocando assim um elevado estresse osmótico nas plantas, como já foi observado em *Annona muricata* L. (gravioleira) pela presença de sorbitol (LEMOS; BAKER, 1998). Em temperatura de 15°C, o genótipo LA-57 proporcionou as maiores porcentagens de sobrevivência, exceto para os tratamentos contendo somente sacarose, onde não houve diferença significativa. Para a temperatura de 25°C não houve diferença significativa nos tratamentos com 30 g.L^{-1} de sacarose e 10g.L^{-1}de sacarose + 5g.L^{-1} de sorbitol, e para 20 g.L^{-1} de sacarose a maior sobrevivência encontrada foi para o genótipo LA-13.

Tabela 1. Sobrevivência (%), Coloração (notas 1 a 6*), Comprimento de parte aérea (cm) de plantas de erva cidreira brasileira [Lippia alba (Mill) E. N. Br.] conservadas sob crescimento lento aos 90 dias de cultivo em função de reguladores osmóticos, temperatura e genótipos.

	15ºC	25ºC
	LA 57 Sobrevivência (%)	
Sacarose (30)	100,00 aAα	66,67 aBα
Sacarose (20)	93,32 aAα	3,33bcBβ
Sacarose (10) + Manitol (5)	66,67bAα	20,00bBα
Sacarose (10) + Sorbitol (5)	70,00bAα	0,00cBα
	LA 13 Sobrevivência (%)	
Sacarose (30)	100,00 aAα	80,00 aBα
Sacarose (20)	93,32 aAα	46,67bBα
Sacarose (10) + Manitol (5)	0,00bAβ	0,00cAβ
Sacarose (10) + Sorbitol (5)	0,00bAβ	0,00cAα
CV(%)	23,15	
Reguladores osmóticos (g.L-1)	15º C	25º C
	LA 57 Coloração (notas 1 a 6*)	
Sacarose (30)	2,00aAα	3,03aBα
Sacarose (20)	2,06aAα	4,87bBβ
Sacarose (10) + Manitol (5)	2,70aAα	4,37bBα
Sacarose (10) + Sorbitol (5)	2,47aAα	6,00bBα
	LA 13 Coloração (notas 1 a 6*)	
Sacarose (30)	2,30aAα	2,90aAα
Sacarose (20)	2,83aAβ	3,93bBα
Sacarose (10) + Manitol (5)	6,00bAβ	6,00cAα

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Sacarose (10) + Sorbitol (5)	6,00 bAβ	6,00cAα
CV(%)	14,32	
Reguladores osmóticos (g.L-1)	15° C	25° C
	LA 57	
	Comprimento de parte aérea (cm)	
Sacarose (30)	1,73aAα	3,07bBα
Sacarose (20)	1,63aAα	1,07aAα
Sacarose (10) + Manitol (5)	1,30aAα	1,40aAα
Sacarose (10) + Sorbitol (5)	1,60aBα	-
	LA 13	
	Comprimento de parte aérea (cm)	
Sacarose (30)	2,13bAα	2,83bBα
Sacarose (20)	1,63abAα	2,03aAβ
Sacarose (10) + Manitol (5)	-	-
Sacarose (10) + Sorbitol (5)	-	-
CV(%)	28,80	46,27

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, nas colunas, maiúsculas, nas linhas, e gregas, entre genótipos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

* Escala de notas: 1 = folhas verdes; 2 = folhas verde-pálido; 3 = início do secamento das folhas; 4 = entre 30 e 50% de folhas mortas; 5 = mais de 50% de folhas mortas 6 = folhas totalmente mortas.

Na variável coloração houve interação entre temperatura, genótipos e reguladores osmóticos. O genótipo LA-57 não apresentou diferença significativa entre os tratamentos quando utilizada a temperatura de 15ºC. Já a 25ºC o tratamento com 30 $g.L^{-1}$ de sacarose proporcionou a menor média (3,03). Analisando-se ambas as temperaturas notou-se que a temperatura de 15ºC proporcionou as menores notas, consequentemente uma melhor coloração dos explantes, exceto para o genótipo LA-13, quando utilizando sacarose (30 $g.L^{-1}$) e ao utilizar sacarose combinada com manitol e sorbitol, onde as notas foram altas (6,0), indicando pouca coloração.

Resultados contrários foram encontrados em plantas de Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.), onde as plantas mais viáveis foram encontradas no meio suplementado com sacarose (10 $g.L^{-1}$) + sorbitol (5 $g.L^{-1}$) após três meses de cultivo a 18ºC (SANTOS, 2010).

Analisando-se a variável comprimento de parte aérea, notou-se que não houve diferença significativa, exceto para o tratamento com 30 $g.L^{-1}$ de sacarose nos dois genótipos. Os tratamentos com sacarose combinada com manitol e sorbitol foram os que tiveram as piores médias de coloração, provavelmente porque os explantes não se desenvolveram ou morreram com o tamanho em que foram inoculados.

A sobrevivência aos 180 dias foi bem inferior, quando comparada aos 90 dias, nas duas temperaturas. Aos 180 dias a viabilidade das plantas foi comprometida em ambas as temperaturas, mostrando que não é viável conservar LA-13 e LA-57 durante este período, pois compromete as características dos explantes (Tabela 2).

Tabela 2. Sobrevivência (%) de plantas de erva cidreira brasileira [Lippia alba (Mill) E. N. Br.] conservadas sob crescimento lento aos 180 dias de cultivo em função de reguladores osmóticos, temperatura e genótipos.

Reguladores osmóticos (g.L-1)	15º C	25º C
	LA 57	
Sacarose (30)	96,67aAα	53,33aBα
Sacarose (20)	70,00bAα	36,66aBα
Sacarose (10) + Manitol (5)	43,33bcAα	26,27aAα
Sacarose (10) + Sorbitol (5)	26,27cAα	0,00bBα
	LA 13	
Sacarose (30)	20,00abAβ	33,33aAα
Sacarose (20)	26,67aAβ	20,00abAβ
Sacarose (10) + Manitol (5)	0,00bAβ	0,00bAβ
Sacarose (10) + Sorbitol (5)	0,00bAβ	0,00bAα
CV(%)	47,41	46,27

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, nas colunas, maiúsculas, nas linhas, e gregas, entre genótipos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Conclusão

É viável conservar *Lippia alba* por 3 meses em ambas as temperaturas, entretanto os para os genótipos LA-13 e LA-57 conservar por 6 meses compromete as características físicas e a sobrevivência dos mesmos.

Agradecimentos

A CAPES, CNPq e FAPITEC pelo apoio.

Referências Bibliográficas

BRITO AL; ALBUQUERQUE MMS; ALVIM BFM; RESENDE SV; BELLINTANI MC; SANTANA JRF. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, p.1354-1361, 2011.

LEMOS EEP; BAKER D. Shoot regeneration in response to carbon source on intermodal explants of *Annona muricata* L. **Plant Growth Regulation,** v.25, p. 105-112. 1998.

MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2000. 346 p.

MATTOS, S. H.; INNECCO, R.; MARCO, C. A.; ARAÚJO, A. V. **Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará**: tecnologia de produção e óleos essenciais. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007. p. 61-63.(série BNB - ciência e tecnologia 2).

SANTOS VA. 2010. **Micropropagação e conservação *in vitro* de patchouli *(Pogostemon cablin L.)*** (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, SE.

Atividade da Bromelina em Plântulas Micropropagadas de Abacaxizeiro cv. Pérola

Jaci Lima Vilanova Neta[1], Zilna Brito de Rezende Quirino[2]; José Edmário dos Santos[3]; Aparecida Gomes de Araújo[4], Ana da Silva Lédo[5]; Denise Santos Ruzene[6], Daniel Pereira da Silva[7]; Roberto Rodrigues de Souza[8].

Resumo

O abacaxizeiro é de grande importância para a fruticultura, não só pela produção de frutos comercializados *in natura* ou na agroindústria, mas também pelos subprodutos como a bromelina, que é um conjunto de enzimas proteolíticas amplamente usadas na indústria alimentícia, farmacêutica, cervejeira e têxtil, e também no campo da medicina. A propagação *in vitro* apresenta algumas vantagens quando comparada aos sistemas convencionais de propagação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da bromelina em plantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus var. Comosus*), cultivar Pérola, produzidas em diferentes condições de cultivo *in vitro*. A atividade enzimática foi avaliada em tecidos de folhas e caules de plantas cultivadas em diferentes condições de meio formulado por Murashige e Skoog. Os resultados deste estudo, em relação às diferentes estruturas de abacaxi (folhas e caules) *in vitro* mostraram que a atividade da bromelina varia em função das condições de cultivo, do

[1] Mestranda, Universidade Tiradentes (UNIT), Aracaju, SE, jaci_vilanova@yahoo.com.br;
[2] Bolsista da Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE, zilna_br@hotmail.com
[3] Graduando em Licenciatura Química, bolsista FAPITEC/PIBITI, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju - SE, edmario_jeds@hotmail.com.
[4] Engenheira-agrônoma, doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Empresa de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe (Emdagro), Aracaju, SE, agaraujo2003@hotmail.com.
[5] Engenheira-agrônoma, Doutora em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju - SE, ana.ledo@embrapa.br.
[6] Professor da Universidade Tiradentes (UNIT), Aracaju, SE, ruzeneds@hotmail.com.
[7] Professora da Universidade Tiradentes (UNIT), Aracaju, SE, silvadp@hotmail.com.
[8] Professor, Universidade Federal de Sergipe (UFS), São Cristóvão, SE, rrsouza.br@gmail.com.

tempo e da estrutura na qual foi quantificada, assegurando a viabilidade na produção de mudas com altos níveis de bromelina nas fases subsequentes da micropropagação.

Palavras chave: atividade enzimática, abacaxi, propagação *in vitro*.

Introdução

O abacaxi (*Ananas comosus L.*) é uma fruta das regiões tropicais e subtropicais (RAVINDRA BABU, 2008; CORZO, 2008), consumido em todo o mundo, tanto ao natural quanto na forma de produtos industrializados (CORZO, 2011; RAVINDRA BABU, 2008; ABÍLIO, 2009). É a principal fonte da enzima bromelina, nome genérico dado ao conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família Bromeliaceae, da qual o abacaxizeiro é a espécie mais conhecida (PIZA *et al.*, 2002; KUMAR, 2011; DOKO, 1991; DEVAKATE, 2009). O interesse contínuo por bromelina deve-se em especial às suas numerosas aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica, atuando, por exemplo, na modulação do crescimento tumoral, na melhoria da ação dos antibióticos, no tratamento sistêmico da inflamação, e no processamento de alimentos para amaciamento da carne, sendo considerada como um dos suplementos mais populares em países europeus (ROWAN *et al.*, 1990; MYNOTT *et al.*, 1999; MAURER, 2001; BHUI *et al.*, 2009). Assim,o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da bromelina em plantas de abacaxizeiro cultivar Pérola, produzidas em diferentes condições de cultivo *in vitro*.

Material e Métodos

A produção e multiplicação das plantas *in vitro* foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, SE. Os ensaios para a avaliação da atividade da enzima bromelina foram desenvolvidos no Laboratório de Processos de Separação do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe. A atividade da enzima

foi avaliada em folhas e caules de plantas de *Ananas comosus* var. *comosus*, cultivar Pérola, desenvolvidas *in vitro* em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem fitorregulador, nas seguintes condições de cultivo: líquido (ML), líquido com ponte de papel de filtro (MLP), gelificado com ágar (MGA) e gelificado com Phytagel$^{\delta}$ (MGP). O planejamento experimental utilizado foi o fatorial $4^1.2^2$ (quatro condições de meio de cultura, dois órgãos da planta e dois tempos de cultivo *in vitro*), com três repetições e quatro amostras por repetição, resultando num total de 12 amostras para cada tratamento. A enzima foi obtida a partir do extrato bruto da folha e do caule de plantas do abacaxi 'Pérola' *in vitro*, após maceração em tampão fosfato a 0,2 M, em pH 5,7. A determinação da proteína total foi realizada pelo método de Bradford (1976) usando *Coomassie Brilhant Blue G250,* e a atividade enzimática baseando-se no método descrito por Murachi (1976) e Baldini et al. (1993).

Resultado e Discussão

A atividade proteolítica da bromelina variou significativamente entre folhas e caules de abacaxizeiro desenvolvidos *in vitro* nas diferentes condições do meio MS, aos três e quatro meses de cultivo (Figura 1). Sendo que, em ambos os períodos de cultivo a atividade proteolítica em tecidos da folha foi estatisticamente superior em MS líquido com ponte de papel e MS gelificado com ágar, quando comparado aos demais tratamentos. No mesmo período, em MS líquido sem ponte os valores foram bastante reduzidos, não diferindo estatisticamente entre folhas e caules. Para Piza et al. (2002) o processo de diferenciação pode ter influência na formação de enzimas proteolíticas, no entanto, os estágios de desenvolvimento da planta durante o crescimento também exercem influência na síntese da proteína. Segundo esses mesmos autores a atividade proteolítica da enzima depende de vários fatores como variedade, idade e parte da planta da qual é extraída.

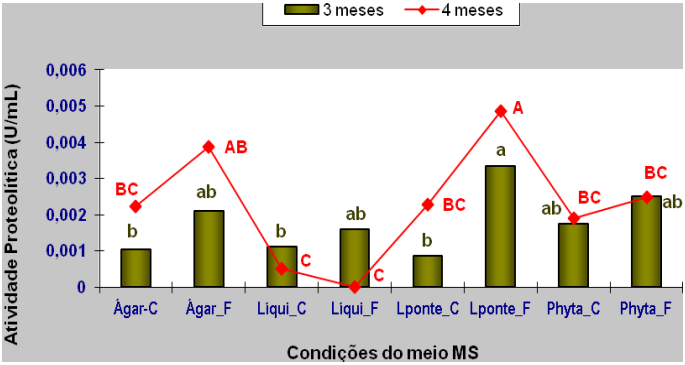

Figura 1. Atividade proteolítica da enzima bromelina em caules (C) e folhas (F) de plantas de abacaxi 'Pérola' desenvolvidas *in vitro* em diferentes condições de meio MS, aos três e quatro meses de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na barra, não diferem entre si (Duncan, p ◘ 0,05)

Folhas e caules de plantas de abacaxizeiro *Ananas comosus* cv. Pérola, desenvolvidas *in vitro*, apresentam bromelinas bioquimicamente ativas. A atividade da bromelina em folhas e caules foi crescente com o aumento do tempo de cultivo, nas condições avaliadas, excetuando-se em meio MS líquido.

Conclusão

Em termos quantitativos os níveis mais expressivos de atividade proteolítica da bromelina foram obtidos em tecidos de folhas de abacaxizeiro, aos quatro meses de cultivo *in vitro,* em MS líquido com ponte de papel de filtro, seguido de MS gelificado com ágar.

Agradecimentos

Os autores agradecem às valiosas contribuições de Dr. Sarah Brandão Santa Cruz Barbosa (in memoriam) durante a execução e finalização deste estudo.

CAPES, FAPITEC, UNIT, EMBRAPA

Referências Bibliográficas

ABÍLIO, G. M. F; HOLSCHUH, H. J; BORA P. S; OLIVEIRA, E. F. Extração, atividade da bromelina e análise de alguns parâmetros químicos em cultivares de abacaxi. **Revista Brasileira de. Fruticultura**, v.31, n. 4, p. 1117-1121, 2009.

BHUI, K.P.S., GEORGE, J., SHUKLA, Y. Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-kappa B against skin tumor-initiation triggering mitochondrial death pathway. **Cancer Letters**, v.282, p.167-176, 2009.

CORZO, C. A; WALISZEWSKI, K. N; WELTI-CHANES, J. Pineapple fruit bromelain afnity to different protein substrates. **Food Chemistry** xxx (2011) xxx–xxx.

DEVAKATE, R.V; PATIL, V.V; WAJE, S.S; THORAT, B.N. Purication and drying of bromelain. **Separation and Purication Technology**, v.64, p. 259–264, 2009.

DOKO, M. B; BASSANI, V; CASADEBAIG, J; CAVAILLES, L; JACOB, M. Preparation of proteolytic enzyme extracts from Ananas comosus L., Merr. fruit juice using semipermeable membrane, ammonium sulfate extraction, centrifugation and freeze-drying processes, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 76, p. 199–206, 1991.

KUMAR, S; HEMAVATHI, A.B; HEBBAR, H. U. Afnity based reverse micellar extraction and purication of bromelain from pineapple (Ananas comosus L. Merryl) waste. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1216–1220, 2011.

MAURER, H.R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 9, p. 1234-1245, 2001.

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

MYNOTT, T.L., LADHAMS, A., SCARMATO, P., ENGWERDA, C.R. Bromelain, from pineapple stems, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase-2 in T cells. **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 2568–75, 1999.

PIZA, I. M. T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G. Reguladores vegetais na micropropagação do abacaxizeiro. **Revista Ceres**. v. 48, n. 280, p.681-690, 2001.

RAVINDRA BABU, B., RASTOGI, N.K., RAGHAVARAO, K.S.M.S. Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**. v.47, p.83–89, 2008.

ROWAN, A. D.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. **Biochemical Journal**, v. 266, n. 3, p. 869-75, 1990.

III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas

Meios de Cultura na Redução da Hiperidricidade *in vitro* de *Ocimum Basilicum*

Jefferson Henrique S. Silva[1]; Andréa Santos da Costa[2]; Maria Fernanda O. Torres[2]; Rosana Barroso Feitosa[3], Maria Clezia dos Santos[1]; Ítala Tainy Barreto Francisco dos Santos[1]; Maria de Fátima Arrigoni-Blank[4]; Arie Fitzgerald Blank[5]

Resumo

Manjericão (*Ocimum basilicum* L.) é uma espécie aromática de grande interesse comercial devido à produção de óleo essencial rico em linalol. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes meio de cultura na redução da hiperidricidade *in vitro* de hibrido de manjericão. O delineamento experimental foi interamente casualizado, com cinco repetições. Testou-se quatro tipos de meio de cultura (MS; MT; ½ MS e ½ nitratos MS). Foi utilizado como fonte de explante o segmento nodal retirado de plantas cultivadas em casa de vegetação. As variáveis avaliadas foram número de brotos e folhas por explante, comprimento de broto por explante, porcentagem de hiperidricidade e massa fresca e seca de parte aérea. Não houve diferença significativa entre os meios de cultura para as variáveis analisadas, exceto para o número de folhas e massa fresca de parte aérea, as quais obtiveram menores médias no meio com ½ MS. A utilização de

[1] Bolsistas de iniciação científica da Universidade Federal de Sergipe (UFS), Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal, São Cristóvão, SE, eng.jeffhenrique@gmail.com, ítala.ufs@hotmail.com, kleezinha.sa@gmail.com.

[2] Mestranda em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe (UFS), Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal, São Cristóvão, SE, rosana.barroso@hotmail.com.

[3] Departamento de Engenharia Agronômica da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, deaasc@yahoo.com.br, fernandalu_a@hotmail.com.

[4] Bióloga, doutora em Química e Biotecnologia, professor da Universidade Federal de Sergipe (UFS), Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal, São Cristóvão, SE, fatima.blank@gmail.com.

[5] Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia, professor da Universidade Federal de Sergipe (UFS), Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal, São Cristóvão, SE, arie.blank@gmail.com.

diferentes tipos de meios não reduziu por completo a hiperidricidade *in vitro*, indicando que outro fator deve estar causando a vitrificação das plantas.

Palavras-chave: manjericão, hiperidricidade, planta medicinal e aromática, cultura de tecidos.

Introdução

Ocimum basilicum Lamiaceae. É uma planta herbácea anual ou perene, dependendo do local em que é cultivado. Existem diversas finalidades para o seu uso na culinária, como planta ornamental, medicinal e aromática, sendo o seu óleo essencial valorizado no mercado internacional pelo teor de linalol (BLANK et al., 2004).

A cultura de tecidos é uma importante técnica para propagação de plantas e vem sendo utilizada com sucesso em várias espécies. A composição do meio de cultura, assim como a concentração dos seus componentes, é fundamental para o desenvolvimento dos tecidos das plantas (CALDAS et al., 1998).

Algumas plantas quando propagadas *in vitro* podem apresentar distúrbios fisiológicos ou morfológicos, conhecidos como vitrificação ou hiperidricidade, o qual representa um sério problema para o desenvolvimento do protocolo. Os explantes vitrificados caracterizam-se por apresentarem folhas translúcidas, túrgidas e com aspecto encharcado, apresentando brotações mal formadas e alongadas. Adicionalmente, plantas vitrificadas não sobrevivem ao transplante para o solo porque, dentre outros fatores, possuem menor teor de massa seca que as normais e são menos lignificadas. Sendo assim, este fenômeno pode causar perdas significativas no processo de propagação *in vitro*, inviabilizando um programa comercial de produção de mudas (HAZARIKA, 2006).

Em alguns casos a vitrificação pode ser revertida, desde que seja realizada a transferência de meio de cultivo e adequar o ambiente, dando atenção especial para a temperatura, irradiância, fotoperíodo e concentrações dos elementos

do meio de cultivo (GUERRA; NODARI, 2006). O nitrogênio é um dos fatores responsáveis pela hiperidricidade ou vitrificação das culturas (HAZARIKA, 2006), resultando em plantas cultivadas in vitro com distúrbio morfológico e fisiológico.

Outro fator que pode impedir a vitrificação é a concentração do agente gelificante no meio de cultura porque altera o potencial osmótico, reduz a disponibilidade de água, nutriente e fitorreguladores. Porém, para o hibrido Sweet Dani x Maria Bonita em ensaio anterior verificou-se que a variação da concentração do gel gelificante não promoveu a redução da vitrificação (COSTA et al., 2011)

Diante desse contexto este trabalho objetivou verificar a influência de composição do meio de cultura na redução da vitrificação *in vitro* de hibrido de manjericão (*Ocimum basilicum*) 'Sweet Dani' x 'Maria Bonita'.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal do Departamento de Engenharia Agronômica da Universidade Federal de Sergipe. Como fonte de explante foi utilizado segmento nodal de plantas do híbrido de manjericão 'Sweet Dani' x 'Maria Bonita' cultivadas em casa de vegetação. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo quatro tipos de meio de cultura (MS; MT; ½ MS e ½ nitratos MS), cada tratamento foi constituído de cinco repetições, sendo cada repetição representada por quatro frascos com dois explantes.

A desinfestação dos explantes foi realizada em água corrente por 30 minutos, em seguida, em câmara de fluxo laminar, os explante foram imersos em solução de álcool 70% por 30 segundos e depois em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 5 minutos sob agitação e lavadas três vezes em água destilada e autoclavada. Os meios de cultura foram acrescidos, com 30 $g.L^{-1}$ de sacarose no meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e 25 $g.L^{-1}$ de sacarose no meio MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969) e 7 $g.L^{-1}$ de ágar, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1.

Em câmara de fluxo laminar, com o auxilio do bisturi e uma pinça, constantemente flambados, os explantes foram seccionados e inoculados em frascos de 250 mL, contendo 25 mL das concentrações de cada tratamento. Os frascos foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2ºC, fotoperíodo de 12 horas de luz e intensidade luminosa de 60 μmol. $m^{-2}.s^{-1}$.

A avaliação foi realizada aos 45 dias de cultivo e foram avaliadas as variáveis número de brotos e folhas por explante, comprimento de broto (mg) por explante, porcentagem de vitrificação e massa fresca e seca (mg) parte aérea. A variável porcentagem de vitrificação foi transformada em arco seno da raiz quadrada de (X/100). Os dados obtidos foram submetidos a análises de variância pelo teste F e, quando significativo foi aplicado o teste de Tukey.

Resultados e Discussão

Não houve interação significativa entre os meios de cultura e as variáveis analisadas, exceto para número de folhas e massa fresca de parte aérea, as quais obtiveram menores médias no meio ½ MS. O maior número de folhas foi obtido no meio MS e MT, porém não diferindo estatisticamente do meio com ½ nitratos MS. Em relação, ao maior acúmulo de massa fresca de parte aérea foi o meio MS que proporcionou a maior massa, não diferindo do meio MT e ½ nitratos MS (Tabela 1).

Tabela 1. Número de folhas e brotos por explante, comprimento de brotos (cm) por explante, massa fresca e seca (mg) de parte aérea (MFPA e MSPA) e porcentagem de vitrificação em explantes de manjericão, em função dos diferentes tipos de meio.

Meios	N°de Folha	N°de broto	Comprimento de broto (cm)	MFPA (mg)	MSPA (mg)	Porcentagem vitrificação
MS	18,67 a	2,02 a	4,90 a	504,0 a	60,0 a	22,5 a
MT	16,29 a	1,67 a	5,55 a	486,0 ab	57,0 a	10,0 a
½ MS	10,52 b	1,69 a	3,36 a	294,0 b	38,0 a	27,5 a
½ Nitratos MS	14,97 ab	1,78 a	5,00 a	462,0 ab	51,0 a	20,0 a
CV(%)	20,13	16,60	27,09	25,49	28,20	60,74

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Conclusão

A concentração de sais presente no meio de cultura, não reduziu a hiperidricidade das plantas *in vitro* do hibrido de manjericão 'Sweet Dani' x 'Maria Bonita'.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e a FAPITEC/SE pelo financiamento da pesquisa.

Referências Bibliográficas

BLANK AF; CARVALHO FILHO JLS; SANTOS NETO AL; ALVES PB; ARRIGONI-BLANK MF; SILVA-MANN R; MENDONÇA MC. 2004. Caracterização morfológica e agronômica de acessos de manjericão e alfavaca. *Horticultura Brasileira*, 22:113-116

CALDAS LS; HARIDASAN P; FERREIRA MEA. 1998. Cultura de tecidos e meios nutritivos. In: TORRES CA; CALDAS LS; BUSO J. *Transformação genética de plantas.* Brasília: Embrapa CNPH, p. 87-132.

COSTA AS; ARRIGONI-BLANK MF; BLANK AF; SANTOS ONA; MATOS DM; SANTOS MDES. 2011. Influência do ágar na redução da hiperidricidade de plantas híbridas de manjericão *in vitro.* In: Encontro de Pós-graduação-UFS.

GRATTAPAGLIA D; MACHADO MA. 1998. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa SPI / Embrapa –CNPH.p.183-260

GUERRA MP; NODARI, RO. Apostila de Biotecnologia -CCA/UFSC (2006). Disponível em **http://www.lfdgv.ufsc.br/Apostila%20Biotecnologia.pdf**. Acesso em abril 2012.

HAZARIKA BN. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108:105-120.

MURASHIGE T, SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.

MURASHIGE T; TUCKER DRH. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969, Riverside. Proceedings. Riverside: University of California, 1969. p.1155-1169.

III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas

Descontaminação de Genótipo de Palma Forrageira para Cultivo Fotoautotrófico

Joel Cabral dos Santos[1], Begna Janine da Silva Lima[1], Núbia Pereira da Costa[2], Jacinto de Luna Batista[3], Carlos Henrique Brito[2], Ana Cláudia de Melo Gonçalves[4]

Resumo

A palma miúda ou doce (*Nopalea cochenillifera* Salm Dyck) tem se destacado pela sua resistência a cochonilha do carmim, espécie do gênero *Dactylopius*. O objetivo nesse trabalho foi de avaliar a eficiência da descontaminação utilizando concentrações de hipoclorito de sódio associados ou não a tween 20 no estabelecimento *in vitro* da palma-doce *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck. Utilizou-se como fonte de explantes brotos e destes, gemas axilares com 0,5 cm2 que foram submetidas a descontaminação e inoculação em MS + 0,5mg/L BAP e incubados em sala de cultivo. Os tratamentos foram constituídos de NaOCl 2,5% de cloro ativo nas concentrações de zero, 10, 20, 30,40 e 50% (v/v), e nas mesmas concentrações acrescidas de duas gotas de Tween 20. O cultivo foi realizado em telado e aos 21 dias foi realizada a avaliação para verificar a efetividade dos tratamentos quanto à presença de contaminação, oxidação e presença de brotações. O hipoclorito com e sem Tweem 20 mostrou-se eficiente na descontaminação dos explantes do genótipo de palma nas concentrações de 10 e 20% (v/v) de NaOCl no cultivo fotoautotrófico.

Palavras-chave: tween, *Nopalea*, luz natural, assepsia.

[1] Graduando (a) em Agronomia, bolsista PET-Conexões de Saberes CCA/UFPB, begna.agro@gmail.com e agronomojoel@gmail.com.
[2] Prof. Adjunto DCB/CCA/UFPB, nubia@cca.ufpb.br.
[3] Prof. Associado II DFCA/CCA/UFPB/Tutor PET, jacinto@cca.ufpb.br.
[4] Graduanda em Ciências Biológicas, CCA/UFPB, ana.claudia15@hotmail.com.

Introdução

A palma forrageira *Opuntia ficus indica* (L) Mill, é muito utilizada no nordeste brasileiro, na alimentação humana e animal. Originada no continente americano, adaptou-se muito bem as regiões Semiáridas do Brasil, sobretudo por ser muito resistente a longos períodos de estiagem, característica bastante seletiva (ALMEIDA NETO et al., 2005). A palma Miúda ou doce (*Nopalea cochenillifera* Salm Dyck) tem se destacado pela sua resistência a cochonilha do carmim, espécie do gênero *Dactylopius*, e por apresentar maior valor nutritivo comparada com outros genótipos como a Gigante e a Redonda cultivados no Estado da Paraíba (VASCONCELOS et al., 2007). Nos últimos anos, foram desenvolvidas técnicas de cultivo *in vitro* para mais de mil espécies, incluindo as cactáceas. As *Opuntias* se multiplicam por estaquia dos cladódios, e a necessidade de grandes quantidades de material demandado por grandes plantações é um sério problema prático. Por essas razões, aplicam-se técnicas de cultivo *in vitro* para se obter um sistema eficiente de multiplicação em grande escala. Essa eficiência implica uma alta taxa de multiplicação, uniformidade genética, peso e volume reduzido em comparação com o método convencional (VILLALOBOS, 2001).

Um dos principais problemas do cultivo *in vitro* é a contaminação por fungos e bactérias no laboratório, levando a grande perda dos explantes. No processo de cultivo *in vitro* tradicional em salas de crescimento o que mais onera são os gastos com energia elétrica. Atualmente vêm se buscando alternativas a essas condições controladas, com a substituição das salas totalmente climatizadas por condições ambientais tais como o uso de luz natural e temperatura ambiente no cultivo *in vitro*. Uma das principais vantagens do cultivo fotoautotrófico é que além da economia se obtêm plantas mais adaptadas as condições ambientais sofrendo menos na aclimatização. Objetivou-se neste trabalho avaliar a eficiência da descontaminação com diferentes concentrações de Hipoclorito de sódio associados ou não a tween 20 no estabelecimento *in vitro* em condições fotoautotróficas da palma-doce *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Ciências Biológicas do CCA/UFPB, Areia-PB e em telado anexo ao laboratório, entre os meses de setembro e agosto de 2011. Utilizou-se como fonte de explantes brotos da *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck, cultivar Palmepa PB1, obtida na Estação Experimental de Lagoa Seca-PB, pertencente a Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária-EMEPA-PB.

Os brotos foram lavados em água corrente e descontaminados em álcool 70% (v/v) por 1 minuto e Hipoclorito de sódio (NaOCl 2,5% de cloro ativo) com e se tween 20 na concentração prevista para cada tratamento, submetido a agitação mecânica por 20 minutos. Após a descontaminação os brotos foram enxaguados na capela de fluxo laminar para retirada do excesso de Hipoclorito, cortados em segmentos de aproximadamente 0,5 cm^2 e inoculados em tubos de ensaio (2,5 x 15 cm) contendo 5 Ml de meio de cultura. O meio utilizado foi MS de Murashige Skoog (1962) 0,5mg/l BAP (6-benzilaminopurina) 7 g/L de Agar, 20 g/L de sacarose e pH ajustado para 5.8. Após a inoculação os explantes foram levados para o telado anexo ao laboratório.

Os tratamentos utilizados foram formados por diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl 2,5% de cloro ativo), os explantes dos tratamentos de um a seis, foram descontaminados nas concentrações de zero, 10, 20, 30,40 e 50% de Hipoclorio (v/v), e de sete à 12 com zero, 10, 20, 30,40 e 50% de NaOCl 2,5% respectivamente, acrescido de duas gotas de Tween 20 em 100ml da solução. Após a inoculação os tubos contendo os explantes foram transferidos para telado com cobertura plástica, com o registro diário da UR e temperatura máxima e mínima. Aos 21 dias foi realizada avaliação para verificar a efetividade dos tratamentos quanto à existência de contaminação, oxidação e presença de brotações. As avaliações foram feitas diariamente após a inoculação. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 12 tratamentos e seis repetições. Os dados obtidos foram submetidos a teste de regressão binomial utilizando o software SAS 9.2 (2010).

Resultados e Discussão

Nas condições do telado com UR mínima média 60% e máxima média de 85%, temperatura mínima média de 17ºC e máxima média de 37ºC, verificou-se que todas as concentrações de hipoclorito com e sem Tweem 20 mostraram-se eficientes na descontaminação dos explantes do genótipo de palma, pois não houve contaminação em nenhum dos tratamentos. Na Figura 1 observa-se o efeito fitotóxico dos descontaminantes, onde nas concentrações de 0 e 10% de NaOCl com e sem tween não apresentaram oxidação significativa, mas a partir da concentração de 20% com e sem tween houve oxidação, e estas foram aumentando com o aumento da concentração do hipoclorito, sendo que na concentração de 40% de hipoclorito sem tween houve uma maior oxidação e consequentemente morte dos explantes, a maior oxidação foi observada na concentração de 50% de hipoclorito com tween. Na Figura 2, observar-se a presença de brotações com e sem tween, onde as brotações nas concentrações de 0 a 20% sem tween apresentaram maior número de brotações, a partir desta concentração houve o decréscimo quanto à presença de brotos nas concentrações de 30, 40 e 50% de hipoclorito sem tween. Os tratamentos que foram descontaminados com hipoclorito + tween, à medida que se usou uma concentração maior de hipoclorito diminuíram o número de brotações, onde a concentração de 0% de hipoclorito com tween desenvolveu um maior número de brotos. AGRA (2006) encontrou resultados diferentes para o cultivo *in vitro* de violeta africana onde o cultivo em telado levou a uma maior contaminação dos explantes e ainda verificou um menor número de brotações que na sala de cultivo.

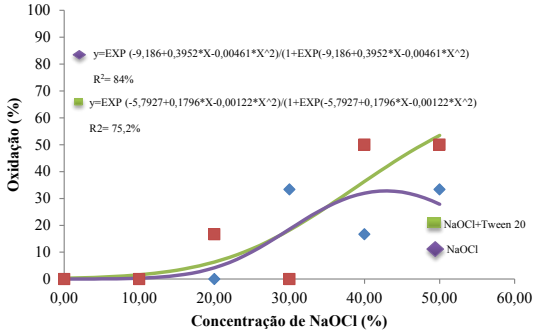

Figura 1. Oxidação em explantes de palma-doce submetidos à descontaminação com diferentes concentrações de NaOCl acrescido ou não de Tween 20.

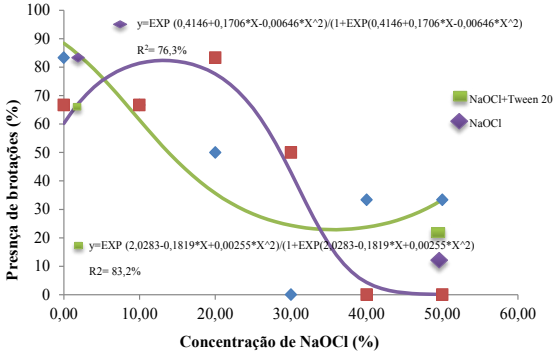

Figura 2. Presença de brotação em explantes de palma-doce submetidos à descontaminação com diferentes concentrações de NaOCl acrescido ou não de Tween 20.

Conclusão

O hipoclorito com e sem Tween 20 mostrou-se eficiente na descontaminação dos explantes do genótipo de palma nas concentrações de 10 e 20% (v/v) de NaOCl no cultivo fotoautotrófico.

Agradecimentos

A CAPES-PET Conexões de Sabres pela concessão da bolsa aos estudantes que desenvolveram a pesquisa.

Referências Bibliográficas

AGRA, P. F.M. **Fontes de irradiação e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de violeta africana (*saintpaulia ionatha* wendl)**. 2006. 46f. Trabalho Graduação (Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2006.

ALMEIDA NETO, J. X.; MEDEIROS, F. P. M.; MELO, A. J. M.; SILVA, J. C.; DANTAS, J. P. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (Opuntia fícus-indica Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (Rattus novergicus, linhagem Wistar) IN VIVO. **Revista de Biologia e Ciência da Terra.** Volume 5, número 2, 2º semestre, 2005.

VASCONCELOS, A. G. V LIRA, M. A.; CAVALCANTI, V. A. L. SANTOS, M. V. F. CÂMARA, T. WILLADINO, L. Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* - Salm Dyck). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.2, n.1, p.28-31, janeiro-março., 2007.

VILLALOBOS, A.V.M. **Aplicação do cultivo de tecidos para a micropropagação de *Opuntia* sp. Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. Roma: FAO Produção e Proteção vegetal, 1995. Tradução (Sebrae/PB), 2001. Paper 132, p. 216, p. 72-78.

III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas

Contaminação de Explantes de Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) em Diferentes Ambientes e Concentrações de Sacarose

Lucinalva Azevedo dos Santos[1], Amanda Tomaz Batista de Araújo[2], Begna Janine da Silva Lima[3], Joel Cabral dos Santos[3], Núbia Pereira da Costa[4], Agenor Correia de Lima Júnior[5]

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes ambientes e concentrações de sacarose na contaminação *in vitro* de Lisianthus. Os experimentos de multiplicação foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal Paraíba e em um telado anexo ao laboratório. Foi utilizado o meio de cultura MS + 0,5 mg. L^{-1} de BAP (6-Benzilaminopurina), suplementado com 7 g L^{-1} de Agar, sendo o pH ajustado para 5,8. Foram testadas três concentrações de sacarose (0,0; 10,0 e 20,0 mg.L^{-1}) em três ambientes diferentes: Ambiente 1- Sala de Crescimento; Ambiente 2- Sala de Laboratório; Ambiente 3- Telado. Concluiu-se que o menor percentual de contaminação de explantes para cultivo *in vitro* de Lisianthus ocorreu para as concentrações de até 10 mg.L^{-1} de sacarose em todos os ambientes de cultivo.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*; ornamental; micropropagação.

[1] Graduanda em Biologia – CCA/UFPB, nalvinha.cat@hotmail.com.
[2] Graduanda em Agronomia, bolsista PIVIC – CCA/UFPB, amandatomaz.agro@gmail.com
[3] Graduando em Agronomia, bolsista PET- Conexões de saberes –CCA/UFPB, begna.agro@gmail.com e agronomojoel@gmail.com.
[4] Profª. Adjunto DCB/CCA/UFPB, nubia@cca.ufpb.br.
[5] Mestre em Zootecnia, técnico do laboratório de Cultura de Tecidos - CCA/UFPB, agenor_zootec@hotmail.com.

Introdução

O lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) é uma espécie que começou a se destacar economicamente no Brasil na década de 90. É uma planta ornamental da família das Gentianaceas, originária da América do Norte, sendo cultivada como flor-de-corte ou em vasos. Em plantas ornamentais, como nas demais espécies vegetais, a qualidade da muda para uma produção comercial ou uma composição paisagística é de grande importância para que se alcancem os objetivos almejados. A produção de uma boa muda depende da qualidade das matrizes e das técnicas de propagação utilizadas. A micropropagação é uma importante estratégia para o melhoramento, clonagem e multiplicação de plantas em larga escala e para obtenção de plantas livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e genética (VILLALOBOS; THORPE, 1991). No processo de cultivo in vitro tradicional em salas de crescimento os cultivos são postos para se desenvolver geralmente, com o fornecimento de luz diário de 16h e em temperatura em torno de 25ºC, mantidos por luz artificial e ar-condicionado. Atualmente vêm se buscando alternativas a essas condições controladas, com a substituição das salas totalmente climatizadas por condições ambientais tais como o uso de luz natural e temperatura ambiente no cultivo in vitro. Estas alternativas já foram testadas com sucesso para algumas ornamentais como crisântemos, orquídeas e violeta africana (BRAGA et al. 2005; DIGNART et al.; 2005 e AGRA 2006). A sacarose é um importante componente na contaminação dos meios de cultivo, segundo Agra et al. (2010) ela é utilizada pelos microrganismos como fonte de energia para realizarem suas reações químicas e como constituinte celular.

Nesse aspecto, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes ambientes de cultivo e concentrações de sacarose na contaminação *in vitro* de Lisianthus.

Material e Métodos

Os experimentos de multiplicação *in vitro* do Lisianthus (*Estouma grandiflorum*) foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal Paraíba (UFPB) e em um telado anexo ao laboratório. Utilizou-se 3 plantas matrizes adultas de Lisianthus produzidas a partir de sementes, cedidas pela Associação de Desenvolvimento Sustentável de Macacos e Furnas (ADESMAF, Areia PB). Dessas plantas foram retiradas 9 folhas medianas que foram utilizadas como fonte de explantes. Visando evitar possíveis variações, todos os tratamentos receberam folhas de todas as plantas. As folhas lavadas em água corrente e descontaminadas em álcool 70% por um minuto e hipoclorito de sódio 20% (v/v), submetidas à agitação mecânica por 20 minutos. Após a descontaminação, as folhas foram enxaguadas em capela de fluxo laminar, com água destilada autoclavada, seguida de três lavagens sucessivas, para remoção do resíduo das soluções descontaminantes. Foram cortadas em segmentos de aproximadamente 1 cm^2 e inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) + 0,5 mg. L^{-1} de BAP (6-Benzilaminopurina), suplementado com 7 g L^{-1} de Agar, sendo o pH ajustado para 5,8 e sacarose na concentração de cada tratamento, 0,0; 10,0 e 20,0 mg.L^{-1}. Posteriormente, os tubos foram vedados com papel alumínio e dispostos em sala de cultivo com diferentes ambientes compondo os tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 3x3 (ambiente x sacarose) totalizando 9 tratamentos com 10 repetições cada. Os dados foram submetidos à análise estatística de variância, com níveis de significância de 1% a 5%. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o software estatístico (SAS 9.0).

Os ambientes de cultivos são descritos a seguir:

Ambiente 1- Sala de Crescimento: Sala iluminada com luz artificial 35 micro mol/m^2 /s, distanciadas em 15 cm, com fotoperíodo de 16 horas de luz controlada por timer programador manual e temperatura média de 25°C ±1°C mantida por ar- condicionado.

Ambiente 2- Sala de Laboratório: Sala iluminada com luz natural, incidente através da janela de vidro e temperatura ambiente. Temperatura média de 26,86 °C ± 5°C e Umidade relativa média de 89,36% ± 5%.

Ambiente 3- Telado: Telado com cobertura plástica de 100 micra e sombrite 50% com temperatura ambiente. Temperatura média de 27,18 °C ± 5°C e Umidade relativa média de 80,55% ± 5%.

As avaliações de contaminação foram realizadas aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a inoculação dos explantes no meio de cultura. Nas avaliações de contaminação foram utilizados dados cumulativos com finalidade de observar o comportamento da contaminação em todos os ambientes ao longo do tempo.

Resultados e Discussão

Os dados de contaminação nos diferentes ambientes de cultivo e concentrações de sacarose são apresentados na Tabela 1. Para os explantes cultivados em sala de crescimento, Ambiente 1, verificou-se que as concentrações de 0,0 e 20,0 $mg.L^{-1}$ de sacarose foram as que apresentaram maiores contaminações. No ambiente 2, sala de laboratório e Ambiente 3 cultivo em telado, a elevação da concentração de sacarose propiciou aumento na contaminação dos explantes, sendo que nas concentrações de 0,0 e 10,0 $mg.L^{-1}$, foram as menores e não diferiram estatisticamente entre si. Os menores valores de contaminação ocorreram na ausência de sacarose, nos ambientes de cultivo em Sala de Laboratório e Telado. Este resultado é explicado segundo Agra et al. (2010) pelo fato da sacarose ser utilizada pelos microrganismos como fonte de energia para

realizarem suas reações químicas e como constituinte celular. Para a maioria das bactérias, a temperatura e a atmosfera de incubação são os principais fatores físicos que devem merecer cuidado no estabelecimento das condições ótimas de crescimento. Esse comportamento talvez não tenha ocorrido para o ambiente 1 na concentração 0,0 mg.L^{-1}de sacarose, devido presença de contaminações endógenas do próprio explante. É importante salientar que a maioria das perdas é atribuída às contaminações bacterianas, que são introduzidas sistematicamente com os explantes, que algumas vezes, não apresentam sintomas nas plantas matrizes ou crescimento visível no meio de cultura, sendo assim chamada de latentes ou endógena, mas que se desenvolvem ao longo do cultivo (FISSE et al., 1987; DEBERGH; VANDERSHAEGHE,1988).

Tabela 1. Percentual médio de contaminação de explantes de lisianthus em diferentes ambientes e concentrações de sacarose.

Sacarose (mg.L-1)	Ambientes		
	1	2	3
0	28 a A	6 b B	6 b B
10	0 b B	15.54 a B	10 a AB
20	22.5 b A	64.38 a A	24 b A

Ambiente 1- sala de crescimento; ambiente 2- sala de laboratório; ambiente 3 - telado. Médias seguidas de letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Conclusão

O menor percentual de contaminação de explantes para o cultivo in vitro de Lisianthus ocorreu para as concentrações de até 10 mg.L^{-1} de sacarose em todos os ambientes de cultivo.

Referências Bibliográficas

AGRA, P. F. M. **Fontes de irradiação e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de violeta africana (*Saintpaulia ionatha* wendl)**. 2006. 46f. Trabalho Graduação (Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2006.

AGRA, P.F.M; SANTOS, M.S; BARROS, H.M.M; COSTA, C.M.G.R; COSTA, N.P; PERAZZO NETO, A. Efeito de ambientes e concentrações de sacarose na contaminação in vitro de violeta africana. **Tecnologia & Ciência Agropecuária,** João Pessoa, v.4, n.1, p.43-47, mar. 2010.

DEBERGH, P.C.; VANDERSHAEGHE, A.M. Some symptoms indicating the presence of bacterial contaminantsin plant tissue cultures. **Acta Horticulturae**, Wageningem**,** v. 225, p.77-82, 1988.

DIGNART S. L.; CASTRO, E. M.; BRAGA, F. T.; PASQUAL, M. **Cultivo de Cattleia walkeriana Gardn (Orcchidaceae) em casa de vegetação**. Horticultura Brasileira V.23, n.2, p.616, agosto 2005.

FISSE, J.; BATALLE, A.; PERA, J. Endogenous bacteria elimination in ornamental plants. **Acta Horticulturae,** v.212, p.87-90, 1987.

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

VILLALOBOS, V. M.; THORPE, T. A. Micropropagación: concepto, metodología y resultados. In: ROCA, W. M.; MROGISNKI, L. A. (ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura:** fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, 1991. cap.6, p.127-142.

III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas

Diferentes Substratos na Aclimatização de Mudas Micropropagadas de *Hyptis Pectinata* L.POIT

Maria Clezia dos Santos[1], Rosana Barroso Feitosa[2], Mariana de Souza Santos[3], Ítala Tainy Barreto Francisco dos Santos[1], Jefferson Henrique Santos Silva[1], Maria de Fátima Arrigoni-Blank[4], Arie Fitzgerald Blank[4].

Resumo

A *Hyptis pectinata,* pertencente à família Lamiaceae, é uma planta muito utilizada na medicina popular para os tratamentos de inflamações, infecção bacteriana e dores no Nordeste brasileiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de diferentes substratos na aclimatização dos acessos SAM 017 e SAM 018 de *Hyptis pectinata* L. POIT. Os experimentos foram realizados no Departamento de Engenharia Agronômica da Universidade Federal de Sergipe, utilizado o delineamento inteiramente casualizado composto por cinco repetições com quatro plantas cada e seis substratos, sendo S1: PCB - Pó de coco + 1g.L^{-1} de calcário + 12 g.L^{-1} de NPK (3-12-6); S2: PCBV- Pó de coco + vermiculita (1:1 v/v) +1 g.L^{-1} de calcário + 12 g.L^{-1} de NPK (3-12-6); S3: PCBV- Pó de coco + vermiculita (2:1 v/v) +1 g.L^{-1} de calcário + 12 g.L^{-1} de NPK (3-12-6); S4: VMS- Vermiculita + sais MS; S5:VB- Vermiculita + 12 g.L^{-1} de NPK (3-12-6) e S6: PCMS- Pó de coco +1 g.L^{-1} de calcário + sais MS, distribuídos em bandeja de poliestireno expandido e mantida em casa de vegetação. A

[1]Bolsistas Iniciação Científica, Universidade Federal de Sergipe - São Cristovão, SE, Brasil., kleezinha.sa@gmail.com/ ítala.ufs@hotmail.com/ eng.jeffhenrique@gmail.com
[2] Mestranda em Biotecnologia de Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe - Universidade Federal de Sergipe - São Cristovão, SE, Brasil. rosana.barroso@hotmail.com .
[3] Mestranda em Agroecossistemas, Universidade Federal de Sergipe - Universidade Federal de Sergipe - São Cristovão, SE, Brasil. marynana89@hotmail.com.
[4] Professores - Universidade Federal de Sergipe - São Cristovão, SE, Brasil. fatima.blank@gmail / arie.blank@gmail.com.

aclimatização das mudas micropropagadas dos acessos SAM 017 e SAM 018 de *H. pectinata* pode ser realizada utilizando os substratos PCMS.

Palavras-chave: *Hyptis pectinata*, micropropagação, aclimatização

Introdução

Hyptis pectinata L. Poit, é um arbusto pertencente à família Lamiaceae conhecida popularmente no Nordeste do Brasil como "sambacaitá". É comumente cultivado nos quintais de muitas casas brasileiras onde a planta é usada como uma preparação analgésica e antiinflamatória obtido das folhas por decocção ou infusão (ARRIGONI-BLANK et al., 2005).

Um grande obstáculo para a micropropagação é a dificuldade de transferir com sucesso as mudas micropropagadas da condição *in vitro* para o solo em razão da diferença entre as duas condições, uma vez que estas precisam alterar seu metabolismo da condição heterotrófica (*in vitro*) para autotrófica (SILVA et al., 2003). Assim a fase de aclimatização se caracteriza como uma adaptação inicial das mudas produzidas em casa de vegetação com condições mais controladas e a posterior implantação das plantas em campo. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de *Hyptis pectinata* L.POIT.

Material e Métodos

Os ensaios foram realizados no Departamento de Engenharia Agronômica da Universidade Federal de Sergipe. Foram utilizadas plantas micropropagadas dos acessos SAM 017 e SAM 018, com 30 dias de cultivo, procedendo-se lavagem em água corrente para retirada do meio aderido as raízes, em seguida foram transferidas para bandejas de poliestireno expandido, e mantidas em casa de vegetação com sombrite de 50% e sistema de nebulização internamente garantindo alta umidade relativa. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com seis substratos, sendo S1: PCB - Pó de coco + 1g.L^{-1} de

calcário + 12 g.L^{-1} de NPK (3-12-6); S2: PCBV- Pó de coco + vermiculita (1:1 v/v) +1 g.L^{-1} de calcário + 12 g.L^{-1} de NPK (3-12-6); S3: PCBV- Pó de coco + vermiculita (2:1 v/v) +1 g.L^{-1} de calcário + 12 g.L^{-1} de NPK (3-12-6); S4: VMS- Vermiculita + sais MS; S5:VB- Vermiculita + 12 g.L-1 de NPK (3-12-6) e S6: PCMS- Pó de coco +1 g.L^{-1} de calcário + sais MS. Cada unidade experimental foi composta por cinco repetições com quatro plantas cada. As avaliações foram realizadas aos 30 dias de cultivo, analisando as variáveis: sobrevivência (%), comprimento de parte aérea (cm), comprimento de raiz (cm), número de brotos, número de folhas e massa seca (mg) de parte aérea e raiz. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Para as variáveis sobrevivência e número de brotos, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Comparando os acessos dentro de cada tratamento, o acesso SAM 017 mostrou-se superior apenas no substrato PCBV (2:1).

A maior média de comprimento de parte aérea (cm) para o acesso SAM 017, foi alcançada utilizando o substrato VMS (31,3 cm) não diferindo significativamente do substrato PCMS. Para o acesso SAM 018 as maiores médias foram obtidas nos substratos VMS e PCMS, no entanto, não diferiram significativamente dos substratos PCBV (1:1 e 2:1). Resultados contrários ao deste trabalho foram encontrados na aclimatização de *Mentha arvensis* L., onde o substrato contendo vermiculita promoveu menor comprimento de raiz (FONSECA et al., 2008). O acesso SAM 017 apresentou-se superior apenas nos tratamentos VMS e PCMS.

Para a variável comprimento de raiz, a maior média (9,3) para o acesso SAM 017 foi obtida pelo substrato VB, não diferindo estatisticamente do substrato VMS (Tabela 1). Para o acesso SAM 018 a maior média (9,5) foi obtida no substrato VMS, não diferindo significativamente dos substratos VB e PCMS. Ao analisar os acessos, observa-se que não houve diferenças significativas entre

eles, exceto no substrato VB, que proporcionou um menor comprimento de raiz para o acesso SAM 018 (Tabela 1).

Tabela 1. Sobrevivência, comprimento de parte aérea de raiz, número de brotos e folhas, massa seca da parte aérea e de raiz para diferentes substratos para os acessos de *H. pectinata.*

	SAM 017	SAM 018
	Sobrevivência (%)	
PCB	90 aA	70 aA
PCBV (1:1)	100 aA	90 aA
PCBV (2:1)	100 aA	65 aB
VMS	100 aA	95 aA
VB	100 aA	85 aA
PCMS	80 aA	95 aA
CV(%)	18,9	
	Comprimento de parte aérea (cm)	
PCB	7,1 dA	5,4bA
PCBV (1:1)	7,7 cdA	8,6 abA
PCBV (2:1)	14,8 bcdA	8,3 abA
VMS	31,3 aA	17,8 aB
VB	18,4 bcA	5,2 bB
PCMS	26,0 abA	19,5 aA
CV(%)	39,1	
	Comprimento de Raiz (cm)	
PCB	4,3 cA	4,1 bA
PCBV (1:1)	5,1 bcA	5,9 bA
PCBV (2:1)	5,7 bcA	5,3 bA
VMS	7,9 abA	9,5 aA
VB	9,3 aA	6,8 abB

Continua...

Tabela 1. Continuação.

	SAM 017	SAM 018
	Comprimento de Raiz (cm)	
PCMS	5,5 bcA	6,5 abA
CV(%)	29,1	
	Número de Brotos	
PCB	1,3 aA	1,4 aA
PCBV (1:1)	1,6 aA	2,6 aA
PCBV (2:1)	2,1 aA	1,5 aA
VMS	1,9 aA	2,6 aA
VB	1,9 aA	1,7 aA
PCMS	1,3 aA	2,2 aA
CV(%)	43,1	
	Número de Folhas	
PCB	9,4 bA	8,7 cA
PCBV (1:1)	9,5 bB	20,9 abA
PCBV (2:1)	14,2 abA	12,6 bcA
VMS	20,2 aB	27,5 aA
VB	15,8 abA	11,7 bcA
PCMS	11,9 abB	22,2 abA
CV(%)	36,9	
	Massa seca da parte aérea (mg)	
PCB	21,8 dA	21,3 bA
PCBV (1:1)	38,1 dA	41,6 bA
PCBV (2:1)	106,3 cA	39,3 bB
VMS	367,2 aA	152,2 aB
VB	100,0 aA	14,0 bB
PCMS	233,5 bA	150,0 aB
CV(%)	30,2	

Continua...

Tabela 1. Continuação.

	SAM 017	SAM 018
	Massa seca de raiz (mg)	
PCB	8,9 dA	6,7 cA
PCBV (1:1)	18,5 dA	15,9 bcA
PCBV (2:1)	39,7 cA	10,3 cB
VMS	219,4 aA	66,5 aB
VB	76,4 bA	4,8 cB

*Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).
S1: PCB - Pó de coco + 1g.L-1 de calcário + 12 g.L-1 de NPK (3-12-6); S2: PCBV- Pó de coco + vermiculita (1:1 v/v) +1 g.L-1 de calcário + 12 g.L-1 de NPK (3-12-6); S3: PCBV- Pó de coco + vermiculita (2:1 v/v) +1 g.L-1 de calcário + 12 g.L-1 de NPK (3-12-6); S4: VMS- Vermiculita + sais MS; S5:VB- Vermiculita + 12 g.L-1 de NPK (3-12-6) e S6: PCMS- Pó de coco +1 g.L-1 de calcário + sais MS.

Para número de folhas, as menores médias (9,4 e 8,7) (Tabela 1) para os acessos SAM 017 e SAM 018 respectivamente, foram obtidas através do substrato PCB.

Em relação às variáveis massa seca da parte aérea e de raiz, as maiores médias foram obtidas a partir do substrato VMS, no entanto, para massa seca de parte aérea, o acesso SAM 017 não diferiu estatisticamente do substrato VB e o SAM 018 do substrato PCMS. Resultados semelhantes foram obtidos na aclimatização de mudas de hortelã japonesa, onde o substrato VMS proporcionou maior acúmulo de massa seca de parte aérea (ARRIGONI-BLANK, 2011). O acesso SAM 017 apresentou-se superior ao SAM 018, não diferindo significativamente apenas nos substratos PCB e PCBV (1:1) para as duas variáveis.

Conclusão

Dessa maneira, o substrato contendo pó de coco e sais do MS, apresenta melhor relação custo-benefício, devido a sua grande disponibilidade na região Nordeste.

Agradecimentos

A CAPES, CNPq e FAPITEC pelo financiamento da pesquisa.

Referências Bibliográficas

ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVA-MANN, R.; CAMPOS, D. A.; SILVA, P. A.; ANTONIOLLI, A. R.; CAETANO, L. C.; SANT'ANA, A. E. G.; BLANK, A. F. Morphological, agronomical and pharmacological characterization of *Hyptis pectinata* (L.) Poit germplasm**. Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n.4, p. 298-303, 2005.

ARRIGONI-BLANK M.F.; COSTA. A.S.; FONSECA, V. O.; ALVES, P. B.; BLANK,A .F. Micropropagação ,aclimatização,teor e composição química do óleo essencial de genótipos de hortelã japonesa. **Revista Ciência Agronômica**, v.42,n 1,p. 175-184, 2011.

FONSECA, V. O.; COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; SANTANA, H. B. Micropropagação, aclimatização e composição química do óleo essencial de Hortelã Japonesa (*Mentha Arvensis* L.). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.4, n.1, p.8-14, 2008.

SILVA, A.B.; PASQUAL, M.; MACIEL, A.L.R.; DUTRA, L.F. BAP e substratos na aclimatização de plântulas de glioxinía (*Sonningia speciosa* Lood. Hiern.) proveniente de cultura de tecidos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.2, p.255-260, 2003.

III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas

Otimização do Processo de Micropropagação de Abacaxizeiro cv. Imperial

Milena Mascarenhas de Jesus Ribeiro[1], Aparecida G. de Araujo[2] , Ana da S. Lédo[3], Josefa G. S. Santana[4], Camila S. Almeida [5], José E. dos Santos[6]

Resumo

Objetivou-se otimizar a multiplicação do abacaxizeiro por meio do estiolamento *in vitro* com uso de sacarose e ácido giberélico e regeneração em diferentes consistência de meio de cultura e condições de luz. Rizomas de abacaxizeiro com 1 cm foram transferidos para frascos contendo meio MS semissólido (6 gL^{-1} de ágar) com os diferentes tratamentos [ácido giberélico (GA_3) (0; 2,5; 5,0 e 10,0 mgL^{-1}) x sacarose (15, 30 e 45 gL^{-1})]. Apos estiolados, os brotos foram transferidos para meio MS líquido estacionário e MS semissólido, em condições de sala de crescimento (luz artificial) e casa de vegetação (luz natural), totalizando quatro tratamentos. O método do estiolamento *in vitro* é viável para abacaxizeiro, sendo recomendado o meio MS padrão. A regeneração de plantas a partir de brotos estiolados é recomendada em meio MS líquido, sendo os frascos incubados sob luz artificial.

Palavras-chave: *Ananas comosus* L., carboidrato, giberelina, estiolamento *in vitro.*

[1] Bolsista, ITI Emdagro, milenarjm@gmail.com.
[2] Pesquisadora, bolsista Emdagro, agaraujo2003@hotmail.com.
[3] Pesquisadora, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Lab. Cultura de Tecidos, ana.ledo@embrapa.br.
[4] Engenheira agrônoma, grasiela_agro@hotmail.com.
[5] Mestranda, UFS, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Lab. de Cultura de Tecidos, kmilinhafsa@hotmail.com.
[6] Bolsista, Pibic, Embrapa Embrapa Tabuleiros Costeiros, Lab. Cultura de Tecidos, edmario_jeds@hotmail.com.

Introdução

A micropropagação de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.), por meio de segmentos nodais estiolados foi relatada, pela primeira vez, por Kiss et al. (1995). Esse método, comparado com a propagação por gemas axilares, tem a vantagem de evitar lesões na zona de regeneração, minimizando a formação de calo e, consequentemente, proporcionando baixos níveis de variação somaclonal (KISS et al. 1995). Além disso, pode apresentar maior alongamento entre os nós, proporcionando aumento no número de brotos por explante (PRAXEDES et al. 2001). Dessa forma, objetivou-se otimizar a multiplicação do abacaxizeiro por meio do estiolamento *in vitro* com uso de sacarose e ácido giberélico e a regeneração em diferentes meios de cultura e condição de luz durante a incubação.

Material e Métodos

Brotações de abacaxizeiro já estabelecidas *in vitro* foram desfolhadas completamente, restando apenas a porção basal com 1(um) cm, que foram transferidos para frascos contendo 30 mL do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) semissólido (6 g/L de ágar) com os diferentes tratamentos os quais foram constituídos por concentrações de ácido giberélico (GA_3) (0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg/L) em combinação com sacarose (15, 30 e 45 g/L). O meio teve seu pH ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem a 121°C, pressão de 1,1 atm por 20 minutos e, em seguida as culturas foram incubadas no escuro a 25 ± 2°C, por dois meses. Após esse período, as plântulas foram avaliadas por meio do número de brotos, número de nós, número de raízes e comprimento da parte aérea. O experimento foi instalado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4x3, num total de 12 tratamentos com seis repetições composta por três explantes cada uma. Após as avaliações, os brotos estiolados foram submetidos à regeneração. Para isso, o sistema radicular dos brotos estiolados foi removido e os segmentos caulinares colocados horizontalmente em frascos contendo 20 mL de meio MS líquido estacionário e

MS semissólido, em condições de sala de crescimento (luz artificial) e casa de vegetação (luz natural), totalizando quatro tratamentos. Foi instalado em DIC e cada repetição constitui-se de um frasco contendo cinco segmentos caulinares estiolados e cada um contendo duas gemas. Aos 60 dias, foi avaliado o número de brotos regenerados a partir de cada segmento estiolado. Os dados de todos os experimentos foram submetidos à análise e as médias comparadas pelo teste de Tukey, do programa Sisvar, a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Os tratamentos apresentaram resultados semelhantes entre si, não ocorrendo diferença significativa para nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 1).

Entretanto, em meio MS padrão, contendo 30 g/L sacarose verificou-se ótimos resultados para número de nós (5,00) e comprimento da parte aérea de 5,77 cm (Tabela 1).

Apesar de os tratamentos não diferenciarem entre si, para número de brotos aqueles adicionados de 30 g/L sacarose e 10, 5 e 2,5 mg/L de ácido giberélico apresentaram maiores valores para esta variável com 2,72; 2,45 e 2,33 brotos, respectivamente (Tabela 1). Já para número de raízes, o maior valor foi obtido em meio MS + 45 g/L sacarose, seguido do meio MS padrão (Tabela 1). As giberelinas controlam o crescimento e desenvolvimento das plantas e atualmente são utilizadas no estiolamento de abacaxizeiro (MOREIRA et al., 2003).

O número de brotos regenerados por número de nós e a variável número de brotos total apresentaram significância entre os tratamentos testados (Tabela 2). Melhores resultados de regeneração *in vitro* de brotos foram obtidos em meio MS líquido e em frascos mantidos em sala de crescimento (Tabela 2). Nota-se que com o uso do meio líquido obteve-se melhores resultados. Segundo Kiss et al. (1995), a taxa de regeneração de mais de um broto por nó indica que foram formadas gemas adventícias.

Tabela 1. Número de brotos (NB), número de nós (NN), comprimento da parte aérea (CPA), em cm e número de raízes (NR) em explantes de abacaxizeiro "Imperial".

Tratamentos	NB	NN	CPA	NR
T1 = 15 g/L sacarose	1,83 a	3,36 a	5,24 a	1,00 a
T2 = 30 g/L sacarose	1,83 a	5,00 a	5,77 a	1,17 a
T3 = 45 g/L sacarose	1,67 a	4,43 a	5,60 a	1,33 a
T4 = 2,5 mg/L de GA3 e 15 g/L sacarose	1,50 a	3,67 a	4,65 a	1,00 a
T5 = 2,5 mg/L de GA3 e 30 g/L sacarose	2,10 a	4,50 a	6,12 a	1,00 a
T6 = 2,5 mg/L de GA3 e 45 g/L sacarose	2,33 a	4,88 a	4,38 a	1,17 a
T7 = 5,0 mg/L de GA3 e 15 g/L sacarose	1,83 a	4,83 a	5,05 a	1,00 a
T8 = 5,0 mg/L de GA3 e 30 g/L sacarose	2,45 a	4,00 a	4,57 a	1,00 a
T9 = 5,0 mg/L de GA3 e 45 g/L sacarose	1,67 a	4,43 a	4,70 a	1,00 a
T10 = 10,0 mg/L de GA3 e 15 g/L sacarose	1,88 a	3,33 a	4,42 a	1,00 a
T11 = 10,0 mg/L de GA3 e 30 g/L sacarose	2,72 a	4,50 a	4,80 a	1,00 a
T12 = 10,0 mg/L -1de GA3 e 45 g/L sacarose	1,93 a	4,17 a	5,38 a	1,00 a

Médias seguidas de mesma letra, na vertical para os tratamentos, não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Número de brotos regenerados por nó (NBR/nó) e número de brotos regenerados por frasco (NBR/frasco) a partir de segmentos estiolados e cultivados em diferentes ambientes e consistência de meios de cultura.

Tratamentos	Imperial	
	NBR/nó	NBR/frasco
Luz artificial e meio líquido	3,19 a	20,33 a
Luz artificial e meio sólido	3,12 a	17.67 a
Luz natural e meio líquido	2,87 a	14,33 a
Luz natural e meio sólido	1,08 b	5,00 b

Médias seguidas de mesma letra, na vertical para os tratamentos, não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Conclusões

O método do estiolamento *in vitro* é viável para abacaxizeiro, sendo recomendado o meio MS contendo 30 g/L de sacarose para a cv. Imperial. A regeneração de plantas a partir de brotos estiolados é recomendada em meio MS líquido e frascos incubados em sala de crescimento (luz artificial).

Agradecimentos

Ao CNPq, à Fapitec-SE, ao Sergipetec e à Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Referências Bibliográficas

KISS E; KISS J; GYULAI G; HESZKY LE. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortScience***,* Alexandria*,* v.30, p. 127-129, feb. 1995.

MOREIRA, M.A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J.G.; FRÁGUAS, C.B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia***,* Lavras, v.27, p. 1002-1006, set-out. 2003.

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

PRAXEDES, S.C.; SILVA JR., A.F. da; FIGUEIREDO, F.L.B.; FIGUEIREDO, M. de L.; CÂMARA, F.A.A.; OLIVEIRA, O.F. de. Estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro Pérola em presença de ANA e AIA. **Caatinga**, Mossoró, v. 14, p. 13-15, dez. 2001.

III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas

Propagação *in vitro* de *Hyptis pectinata*

Rosana Barroso Feitosa[1], Maria Clézia dos Santos[2], Mariana de Souza Santos[1], Ítala Tainy Barreto Francisco dos Santos[2], Jefferson Henrique Santos Silva[2], Maria de Fátima Arrigoni-Blank[3]; Arie Fitzgerald Blank[3]

Resumo

Hyptis pectinata é uma espécie medicinal amplamente utilizada na medicina popular para tratamentos de inflamações e infecções bacterianas. O presente trabalho objetivou avaliar a eficiência do carvão ativado e 6-benzilaminopurina na micropropagação de acessos de *Hyptis pectinata*. Foram utilizados os acessos SAM 016, SAM 017 e SAM 018 de *Hyptis pectinata* em um delineamento inteiramente casualisado, composto por quatro tratamentos com cinco repetições, sendo quatro frascos com dois explantes cada. O meio básico foi o MS com um quarto dos nitratos de amônia e nitrato de potássio e metade dos demais sais, acrescido de 30 $g.L^{-1}$ de sacarose, 7 $g.L^{-1}$ de ágar e pH ajustado para 5,5 ±0,1 antes da autoclavagem a 121°C e pressão de 1,05 atm por 15 minutos. Os tratamentos aplicados foram: 1) meio básico; 2) meio básico + 1% de carvão ativado; 3) meio básico + 0,5 $mg.L^{-1}$ BAP e 4) meio básico + 1% de carvão ativado + 0,5 $mg.L^{-1}$ BAP. As avaliações foram realizadas aos 30 dias de cultivo, analisando as variáveis: número e comprimento (cm) das brotações e massa seca (mg) de parte aérea. O maior número de brotos por explante foi obtido para os três acessos em meio MS básico sem adição de regulador de crescimento. Já para comprimento de brotos, as maiores médias foram obtidas em meio na presença de carvão ativado. Para massa seca de parte aérea, não houve diferença significativa entre os tratamentos para os acessos

[1] Alunas de Pós-graduação - Universidade Federal de Sergipe - São Cristovão, SE, Brasil. rosana.barroso@hotmail.com.
[2] Alunas de Graduação - Universidade Federal de Sergipe - São Cristovão, SE, Brasil. kleezinha.sa@gmail.com.
[3] Professores da Universidade Federal de Sergipe - São Cristovão, SE, Brasil. fatima.blank@gmail e arie.blank@gmail.com.

SAM-017 e SAM-018. Para o acesso SAM 016 o maior valor de massa seca foi proporcionado pelo meio MS suplementado apenas com 0,5 mg.L^{-1} de BAP.

Palavras-chave: planta medicinal, 6-benzilaminopurina, sais minerais.

Introdução

A espécie *Hyptis pectinata*, pertecente a família Lamiaceae, também conhecida popularmente como "sambacaitá" ou "canudinho", carateriza-se como planta medicinal amplamente utilizada no Nordeste brasileiro para tratamentos de inflamações e infecções bacterianas.

Uma alternativa ao processo convencional de propagação do "sambacaitá" por meio de sementes é a técnica da micropropagação *in vitro*. Altas taxas de multiplicação podem ser alcançadas por esse método, com inúmeras vantagens em relação à multiplicação em campo, como a produção de mudas de qualidade superior, em tempo e espaço reduzidos. A adequação do meio de cultura, tipo de explantes, reguladores de crescimento são necessários para o sucesso da micropropagação *in vitro*.

Cada espécie de planta requer um meio de cultura específico para propagação *in vitro*, tornando fundamental o estudo da composição em sais minerais, suplementos orgânicos, balanceamento e tipo de reguladores vegetais para a indução da diferenciação da parte aérea ou raiz das plantas (SANTOS et al., 2005).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência do carvão ativado e 6-benzilaminopurina na micropropagação de acessos de *Hyptis pectinata*.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal do Departamento de Engenharia Agronômica da UFS. Para o estabelecimento foram utilizados explantes nodais de plantas estabelecidas *in vitro* dos genótipos SAM 016, SAM 017 e SAM 018. O delineamento foi o inteiramente casualisado composto por quatro tratamentos com cinco repetições, sendo quatro frascos com dois explantes cada. O meio básico foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com um quarto dos nitratos de amônia e nitrato de potássio e metade dos demais sais, acrescido de 30 $g.L^{-1}$ de sacarose, 7 $g.L^{-1}$ de ágar e pH ajustado para 5,5 ±0,1 antes da autoclavagem a 121°C e pressão de 1,05 atm por 15 minutos. Os tratamentos aplicados foram: 1) meio básico; 2) meio básico + 1% de carvão ativado; 3) meio básico + 0,5 $mg.L^{-1}$ BAP e 4) meio básico + 1% de carvão ativado + 0,5 $mg.L^{-1}$ BAP. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 25 ± 1°C e intensidade luminosa de 60 μmol. $m^{-2}.s^{-1}$.

As avaliações foram realizadas aos 30 dias de cultivo, analisando as variáveis número de brotos por explante, comprimento das brotações (cm) e massa seca (mg) da parte aérea. Os resultados foram submetidos à analise de variância e as medias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

O maior número de brotos por explante foi obtido para os três acessos em meio MS básico sem adição de regulador de crescimento não diferindo significativamente dos demais tratamentos para os acessos SAM 017 e SAM 018 e dos tratamentos T2 e T4 para o acesso SAM 016. Resultados diferentes foram encontrados em plantas de *Salvia fruticosa* Mill (ARIKAT et al., 2004) e em *Ocimum basilicum* L.(REBOUÇAS, 2009), onde um maior número de brotações foi obtido em meio MS suplementado com BAP. Comparado os acessos dentro de cada tratamento, observa-se que o SAM-016 obteve maior número de brotos por explante, variando de 3,3 a 5,3 brotos.

Um maior comprimento de brotos para os acessos avaliados foi obtido em meio na presença de carvão ativado quando comparados com aqueles cultivados na ausência deste antioxidante. Menores médias foram registradas em meio contendo apenas BAP (T3). Resultados diferentes foram obtidos por Reis et al. (2008) trabalhando com *Melissa officinalis* L. onde constataram que plântulas subcultivadas em meio MS contendo 1,0 $mg.L^{-1}$ de BAP apresentaram maior número de brotos. O acesso SAM 016 apresentou menores comprimentos de brotos (0,3 a 0,9 cm) em todos os tratamentos avaliados.

Para massa seca de parte aérea, não houve diferença significativa entre os tratamentos para os acessos SAM-017 e SAM-018. Para o acesso SAM 016 o maior valor de massa seca foi proporcionado pelo meio MS suplementado apenas com 0,5 $mg.L^{-1}$ de BAP (7,6 mg). Em hortelã-pimenta um maior acúmulo de massa seca foi obtido em meio suplementado com 2 $mg.L^{-1}$ de BAP e 1 $mg.L^{-1}$ de TDZ (ASMAR et al., 2011). Comparando os diferentes acessos, observa-se que o SAM-018 obteve maiores médias de massa seca (7,6 a 9,9 mg) em relação aos demais acessos.

Tabela 1. Influência do BAP e carvão ativado na micropropagação dos genótipos SAM-016, SAM-017 e SAM-018.

	SAM 016	SAM 017	SAM 018
		Número de brotos	
T1	5,3 aA	2,1 aC	3,6 aB
T2	4,4 abA	1,6 aC	3,0 aB
T3	3,3 bA	2,0 aA	2,6 aA
T4	4,3 abA	1,9 aB	2,9 aB
CV (%)		26,1	
		Comprimento de brotos (cm)	
T1	0,6 abB	1,3 bA	1,1 bA
T2	0,8 aB	2,1 aA	1,8 aA
T3	0,3 bB	1,2 bA	1,0 bA
T4	0,9 aB	2,2 aA	2,0 aA
CV (%)		19,8	
		Massa seca de parte aérea (mg)	
T1	3,8 bB	6,7 aAB	9,3 aA
T2	3,6 bB	5,8 aAB	8,3 aA
T3	7,5 aAB	5,2 aB	9,9 aA
T4	3,5 bB	6,2 aAB	7,6 aA
CV (%)		32,0	

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

T1: meio básico; T2: meio básico + 1% de carvão ativado; T3: meio básico + 0,5 mg.L-1 BAP; T4: meio básico + 1% de carvão ativado + 0,5 mg.L-1 de BAP.

Conclusão

Os acessos SAM 016, SAM 017 e SAM 018 podem ser micropropagados em meio MS básico na presença de carvão ativado.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e a FAPITEC/SE pelo financiamento da pesquisa.

Referências Bibliográficas

ARIKAT, NA; JANAD, FM; KARAM, NS; SHIBLI, RA. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (Salvia fruticosa Mill.). **Scientia Horticulturae,** v.100, p.193-202, 2004.

BUENO, LC de S; MENDES, ANG; CARVALHO, SP. **Melhoramento genético de plantas:** princípios e procedimentos. 2.ed. Lavras: UFLA, 319p. 2006.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassys with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum,** v.15, p.473-479.

REBOUÇAS, F.S. **Cultivo in vitro de plantas medicinais:** *Ocimum basilicum* L. e *Cissus sicyoides* L. 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2009).

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**. v. 55, n.3, p. 160- 167, 2008.

SANTOS, ASA; MACHADO, IS; LEÃO, AL; RAMOS, AA. Concentrações de BAP e TDZ na propagação *in vitro* de curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith): a influência das citocininas sintéticas na cultura de tecido. **Revista de Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento,** Brasília, v.8, n.35, 2005.

Embriogênese Somática em Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

Zilna Brito de Rezende Quirino[1]; Ana da S. Lédo[2]; Aparecida G. de Araujo[3]; Renata S. Mann[4]; Kelly C. S. Teixeira[5]; Jaci L. Vilanova-Neta[6]; José E. dos Santos[7]; Milena M. de J. Ribeiro[8]

Resumo

A cana-de-açúcar (*Saccharum* ssp.) é uma planta da família *Poaceae*, perene, bastante cultivada em países das regiões tropical e subtropical. Embriogênese somática é o processo pelo qual células ou tecidos somáticos se desenvolvem até a formação completa de uma planta através de uma série de estágios característicos do desenvolvimento de embriões zigóticos. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na indução de calos embriogênicos, na presença e ausência de carvão ativado, no estabelecimento *in vitro* da cultivar RB92579 de cana-de-açúcar. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 tratamentos e 3 repetições. Foram testadas as seguintes concentrações de 2,4-D: 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg/L na ausência de carvão ativado (CA); e 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg/L, na presença de 0,3% de CA. Após inoculação os frascos foram mantidos no escuro e com 30 dias avaliou-se a porcentagem de indução de calos embriogênicos. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e, quando significativos, comparados por regressão polinomial. Houve interação significativa dos tratamentos para porcentagem

[1] Bolsista DTI - CNPq/Sergipetec/Embrapa (CPATC), LCTP; zilna_br@hotmail.com.
[2] Pesquisadora Embrapa Tabuleiros Costeiros, LCTP; ana.ledo@embrapa.br.
[3] Pesquisadora Bolsista Emdagro; agaraujo2003@hotmail.com.
[4] Professora Doutora UFS/DEA; renatamann@hotmail.com.
[5] Gestora de Biotecnologia, Sergipetec; kelly.teixeira@sergipetec.br.
[6] Mestranda Universidade Tiradentes; jaci_vilanova@yahoo.com.br.
[7] Bolsista PIBIC – UFS/Embrapa Tabuleiros Costeiros, LCTP; edmario_jeds@hotmail.com.
[8] Bolsista ITI – Emdagro; milenarjm@gmail.com.

de calos, sendo observada a significância do desdobramento apenas para os tratamentos que não continham carvão ativado. Para porcentagem de calos em cana-de-açúcar, melhores resultados foram registrados com 2,7 mg/L de 2,4-D. No entanto, analisando o custo deste regulador, a dose recomendada para as condições de trabalho foi 1,0 mg/L de 2,4-D.

Palavras-chave: calos embriogênicos, regulador de crescimento, carvão ativado.

Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* ssp.) é uma planta da família Poaceae, perene, bastante cultivada em países das regiões tropical e subtropical. É amplamente cultivada em escala mundial devido a sua importância econômica (PICELLI, 2010). Em 2010 ocupou 9.164.756 de hectares no Brasil, com produção de 717.462.101 toneladas (IBGE, 2010). O Estado de Sergipe nos próximos anos deverá aumentar a área de produção de cana-de-açúcar, que em 2010, segundo dados do IBGE, ocupou 46.665 ha com a produção de 2.994.819 toneladas.

Dentre as práticas da cultura de tecidos utilizadas na produção de mudas em massa, destaca-se a embriogênese somática, que é o processo pelo qual células ou tecidos somáticos se desenvolvem até a formação completa de uma planta através de uma série de estágios característicos do desenvolvimento de embriões zigóticos (BARROS, 1999). A embriogênese somática desempenha um papel importante na propagação clonal. Quando integrado com programas de melhoramento genético convencional e molecular, a embriogênese somática fornece uma ferramenta valiosa para aumentar o ritmo de melhoramento genético de espécies de culturas comerciais (MENEZES et al., 2012).

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na indução de calos embriogênicos, na presença e ausência de carvão ativado, no estabelecimento *in vitro* da cultivar de cana-de-açúcar RB92579.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe. Foram utilizados ápices caulinares excisados de palmitos da cultivar de cana-de-açúcar RB-92579, com aproximadamente 8 meses de idade, proveniente da fazenda Pedras, localizada no município de Maruim, estado de Sergipe.

Os palmitos foram desinfestados em câmara de fluxo laminar com álcool a 70% e hipoclorito de sódio a 2%, com tríplice lavagem com água estéril. Em seguida, os ápices caulinares foram excisados e inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 3% sacarose e gelificado com 0,45% de phytagel®. O pH do meio foi ajustado para 5,8 ± 0,1 e submetido a autoclavagem por 15 minutos a uma temperatura de 121 ±1°C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 tratamentos e 3 repetições, sendo cada repetição composta por 5 frascos, com um explante em cada frasco. Os tratamentos testados foram: T1 - MS + 0,0 mg/L de 2,4-D; T2- MS + 1,0 mg/L de 2,4-D; T3- MS + 2,0 mg/L de 2,4-D; T4- MS + 3,0 mg/L de 2,4-D; T5- MS + 4,0 mg/L de 2,4-D; T6 - MS + 0,0 mg/L de 2,4-D + 0,3% de carvão ativado (CA); T7 - MS + 1,0 mg/L de 2,4-D + 0,3% de carvão ativado (CA); T8 - MS + 2,0 mg/L de 2,4-D + 0,3% de carvão ativado (CA); T9 - MS + 3,0 mg/L de 2,4-D + 0,3% de carvão ativado (CA); T10 - MS + 4,0 mg/L de 2,4-D + 0,3% de carvão ativado (CA). Após inoculação os frascos contendo 30 mL de meio MS foram mantidos no escuro em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2° C, em um fotoperíodo de 12 horas de luz e intensidade luminosa de 60 μmol. $m^{-2}.s^{-1}$. Após 30 dias avaliou-se a porcentagem de indução de calos embriogênicos. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e, quando significativos, comparados por regressão polinomial.

Resultados e Discussão

Houve interação significativa para porcentagem de calos, sendo observada a significância do desdobramento apenas para os tratamentos que não continham carvão ativado.

Para porcentagem de calos em cana-de-açúcar, melhores resultados foram registrados com 2,7 mg/L de 2,4-D, conforme pode-se observar na figura 1.

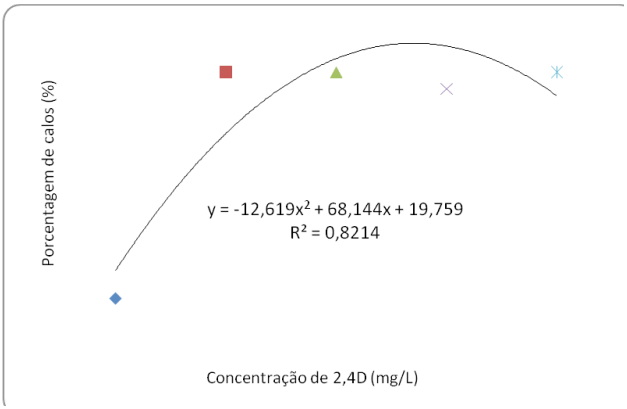

Figura 1. Porcentagem de calos (%) em função das concentrações de 2,4D (mg/L) sem carvão ativado da variedade RB92579 de cana-de-açúcar.

Segundo Menezes et al. (2012), que estudaram a indução de calos embriogênicos com 2,4-D, em variedades superiores de cana-de-açúcar, na ausência de regulador de crescimento não houve formação de calos, enquanto que com a utilização de 2,4-D (1,0-6,0 mg/L) a formação de calos foi de 100%. Resultados semelhantes foram obtidos por Lima (2010) com a utilização de explantes de folha das variedades RB739735 e RB72454, nos quais originaram calos (70 e 100%), quando cultivados em meio MS suplementado com 3,0 mg/L de 2,4-D, o que comprova que este trabalho obteve resultados similares.

Entretanto, com a utilização de 1,0 mg/L de 2,4-D a média observada foi de 100% e a média estimada 75,3%. Analisando o custo deste regulador podemos inferir que essa é a dose recomendada para as condições em que este trabalho foi realizado.

Conclusão

- Para indução de calos de cana-de-açúcar da variedade RB92579, recomenda-se a utilização de 1,0 mg/L de 2,4-D.

Referências Bibliográficas

BARROS, L. M. Embriogênese Somática. Pré-requisito para o emprego de algumas técnicas de biotecnologia no melhoramento genético de plantas perenes. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.** v. 2, n. 7, p. 36-39, 1999.

IBGE. **Produção agrícola municipal - 2010**. disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 20 mai. 2012.

LIMA, G. V. M., Ação de auxinas e cofatores fenólicos no enraizamento *in vitro* de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). 2010. 96f. (Dissertação) - Programa de Pós-Graduação Botânica, UFRPE, Recife, 2010.

MENEZES, T. S. A.; SANTOS, T. C.; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; BLANK, A. F. Embriogênese somática de variedades superiores de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) **Revista GEINTEC** – ISSN: 2237-0722. São Cristóvão/SE – 2012. v. 2, n. 1, p. 32-41, 2012.

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

PICELLI, E. C. M. **Cultura de tecidos e transformação genética com o gene Ddm1 no estudo do silenciamento de elementos de transposição em cana-de-açúcar.** 2010. 141f. (Dissertação) –Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de plantas. Piracicaba, SP, 2010.

Germinação in vitro de *Genipa americana* L

Camila Santos Almeida[1], Ana da Silva Ledo[2], Aparecida Gomes de Araujo[3], Milena Mascarenhas de Jesus Ribeiro[4], Zilná Brito de Rezende Quirino[5], José Edmário dos Santos[6], Jaci Lima Vilanova- Neta[7]

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes meios de cultura na germinação *in vitro* de sementes de jenipapeiro. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, SE. Foram utilizadas sementes de frutos maduros de jenipapeiro provenientes de Nossa Senhora das Dores- SE e testadas diferentes variações de sais MS e sacarose: T1) Meio MS + 30 g L^{-1} de sacarose; T2) MS + 15 g L^{-1} de sacarose; T3) ½ MS + 30 g L^{-1} de sacarose; T4) ½ MS + 15 g L^{-1} de sacarose e T5) Água + 6,0 g L^{-1} de *á*gar. Os tratamentos 1, 2, 3 e 4 foram gelificados com 4,5 g L^{-1} de phytagel®. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. As plântulas foram avaliadas aos 90 dias e todas as variáveis foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. A análise de variância demonstrou que houve efeito significativo dos meios de cultura testados para as duas variáveis analisadas: número de explantes germinados *in vitro* e porcentagem de germinação *in vitro.* À medida que as concentrações do meio MS foram reduzidas, houve um acréscimo do número de explantes

[1]Mestranda, UFS, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Lab. de Cultura de Tecidos, kmilinhafsa@hotmail.com
[2] Pesquisadora, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Lab. Cultura de Tecidos, ana.ledo@embrapa.br
[3] Pesquisadora, Bolsista, Emdagro, agaraujo2003@hotmail.com
[4] Bolsista, ITI/Emdagro, milenarjm@gmail.com
[5] Engenheira Agrônoma Mestre UFS/NEREN, zilna_br@hotmail.com
[6] Bolsista, Pibic, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Lab. Cultura de Tecidos, edmario_jeds@hotmail.

germinados *in vitro* e na porcentagem de germinação *in vitro* de plântulas de jenipapeiro.

Palavras-chave: propagação *in vitro*; cultura de tecidos; jenipapeiro

Introdução

A *Genipa americana* L. é uma espécie que apresenta importância econômica tanto pelas suas características madeireiras quanto por seus frutos, que possuem vários atributos medicinais, alimentícios e cosméticos, o que causa ação extrativista sem nenhum cuidado de preservação e conhecimento da espécie (SANTOS et al., 2011).

É uma espécie considerada de alto potencial para uso imediato entre as demais espécies nativas da região Nordeste do Brasil (FERREIRA et al., 2005). Apesar do conhecimento do potencial produtivo e da adaptabilidade do jenipapeiro nas diversas regiões tropicais, são poucos os trabalhos sobre esta espécie (BTFP, 2005).

As técnicas de cultura de tecidos surgem como uma alternativa altamente viável para o estabelecimento de bancos de germoplasma *in vitro* de esp***écies nativas*** poucos estudadas (ROCHA, 2006). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes meios de cultura na germinação *in vitro* de sementes de jenipapeiro.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju- SE. Frutos maduros de jenipapo foram coletados de populações naturais de Nossa Senhora das Dores- SE e passaram por processo de beneficiamento. As sementes foram inoculadas em diferentes meios de propagação: T1) Meio MS + 30 g L^{-1} de sacarose; T2) MS + 15 g L^{-1} de sacarose; T3) ½ MS + 30 g L^{-1} de sacarose; T4) ½ MS + 15 g L^{-1}

de sacarose e T5) Água + 6,0 g L^{-1} de *á*gar. Os tratamentos 1, 2, 3 e 4 foram gelificados com 4,5 g L^{-1} de phytagel®. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2°C, umidade relativa do ar média em torno de 70% com fotoperíodo de 12 horas de luz e intensidade luminosa de 60 μmol $m^{-2}s^{-1}$, fornecida por lâmpada fluorescente branca.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições por tratamento, sendo cada tratamento composto por dezesseis frascos (5 sementes/frasco). As plântulas germinadas *in vitro* com 90 dias de cultivo foram avaliadas com relação ao número de explantes germinados *in vitro* e porcentagem de explantes germinados *in vitro*. No ensaio de propagação as médias das variáveis foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR.

Resultados e Discussão

A análise de variância demonstrou que houve efeito significativo dos meios de cultura testados para as duas variáveis analisadas: número de explantes germinados *in vitro* e porcentagem de germinação *in vitro* (Tabela1). Observou-se que os tratamentos T3, T4 e T5 apresentaram resultados superiores aos tratamentos T1 e T2, para as duas variáveis, sendo o T5 (água + ágar) o melhor meio de cultivo para a germinação de sementes, apresentando porcentagem de germinação de 83,75 % (Tabela 1).

Tabela 1. Médias do número de explantes germinados in vitro e porcentagem de germinação *in vitro* de plântulas de jenipapeiro cultivadas em diferentes meios de cultura.

Tratamentos	Número de explantes germinados	% de explantes germinados
1	0,625 c	12,50 c
2	2,00 bc	40,00 bc
3	2,94 ab	58,75 ab
4	3,06 ab	60,00 ab
5	4,19 a	83,75 a
Média	2,562	51,00
CV (%)	28,19	28,24

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, ao nível de 1% pelo teste de Tukey. T1) Meio MS + 30 g L-1 de sacarose; T2) MS + 15 g L-1 de sacarose; T3) ½ MS + 30 g L-1 de sacarose; T4) ½ MS + 15 g L-1 de sacarose e T5) Água + 6,0 g L-1 de ágar.

À medida que as concentrações do meio MS foram reduzidas, houve um acréscimo do número de explantes germinados *in vitro* e na porcentagem de germinação *in vitro* de plântulas de jenipapeiro, provavelmente devido às sementes apresentarem reservas suficientes para a indução do desenvolvimento dessas plântulas e também pelo fato do meio MS apresentar concentrações de nutrientes acima daquelas requeridas pelo explante para início de sua germinação sendo esse excesso prejudicial.

Conclusão

O tratamento contendo ***Água + 6,0 g L***$^{-1}$ de ***ágar*** é o mais recomendado para estratégias de germinação *in vitro* de jenipapeiro.

Agradecimentos

À Embrapa e a FAPITEC-SE pelo aporte de recursos financeiros e a Capes pela concessão de bolsa de pós-graduação.

Referências Bibliográficas

BTFP - BIOTRADE FACILITATION PROGRAMME. **Market brief in the european union for selected natural ingredients derived from native species - *Genipa americana* jagua, huito**. united nations conference on trade and development, p.38, 2005.

FERREIRA, E. G. et al. Frutíferas. In: SAMPAIO, E.V.S.B.; PAREYN, F.G.C.; FIGUEIRÔA, J.M. de; SANTOS JUNIOR, A.G. (Org.). **Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial.** Recife: Associação Plantas do Nordeste, p.49-100, 2005.

ROCHA, M. A. C. **Morfogênese *in vitro* em jenipapeiro (*Genipa americana* L.).** Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Federal da Bahia, p.1-66, 2006.

SANTOS, A. R. F.; SILVA, R. M.; FERREIRA, R. A. Restrição hídrica em sementes de Jenipapo (*Genipa americana* L.). **Revista Árvore**, Viçosa, v.35, n.2, p.213-219, 2011.

Embrapa

Tabuleiros Costeiros

Patrocínio:

FAPITEC-SE
FundaÃ„o de Apoio ‡ Pesquisa e ‡ InovaÃ„o TecnolÚgica do Estado de Sergipe

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA