



**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE GLADIÓLO  
(*Gladiolus x grandiflorus* L.)**

**FERNANDA CRISTIANE SIMÕES**

**2001**

52092

Mir 366441

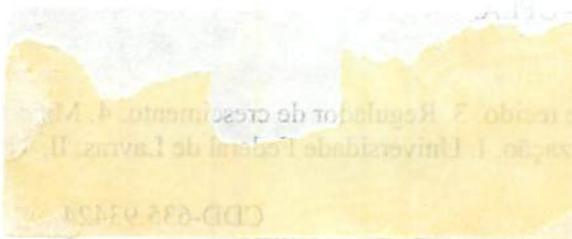
**FERNANDA CRISTIANE SIMÕES**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE GLADIÓLO**  
**(*Gladiolus x grandiflorus* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva



LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2001

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Simões, Fernanda Cristiane

Propagação *in vitro* de gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* L.) / Fernanda  
Cristiane Simões. -- Lavras : UFLA, 2001.

65 p. : il.

Orientadora: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Gladiolo. 2. Cultura de tecido. 3. Regulador de crescimento. 4. Meio MS. 5.  
Carvão ativado. 6. Estomatização. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.93424

**FERNANDA CRISTIANE SIMÕES**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE GLADIÓLO  
(*Gladiolus x grandiflorus* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 26 de abril de 2001.

Prof. Moacir Pasqual UFLA

Prof. Renato Paiva UFLA

  
Prof. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

**“Cada planta é um mistério cujas leis nos desafiam; cuja razão de ser, preferências, aversões e inter-relações ensinam-nos uma lição que deveria nos fornecer uma compreensão melhor do mundo em que vivemos.”**

**ROBERTO BURLE MARX**

**Aos meus pais, Manoel José Maria Simões e  
Maria José Turini Simões, por todo o amor,  
apoio e confiança.**

**DEDICO**

**A profa. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva,  
por toda orientação, amizade, paciência e  
oportunidades proporcionadas.**

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Às minhas irmãs, Ana, Andrea e Cinthya, aos meus cunhados e as minhas sobrinhas, Caroline e Rafaela.

Em especial ao Guilherme Neri pelo amor, cumplicidade e apoio em todas as horas.

Ao professor Moacir Pasqual, pela co-orientação tão bem prestada.

Ao membro da banca Prof. Renato Paiva.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Agricultura, pelo suporte e estrutura.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos laboratoristas Vantuil Antônio Rodrigues e Antônio Clarete de Oliveira, por toda colaboração, auxílio e descontração nas horas certas.

Aos colegas Renata, Arnoldinho, Lilian, Vanessa, Larissa, pelo auxílio e sugestões.

À Fernanda Vieira, pela amizade, mesmo à distância.

A todos os colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos.

À Teca e à Lilica, pelo carinho e companhia.

A todos aqueles que incentivaram e apoiaram direta ou indiretamente esta conquista.

E, acima de tudo, a Deus, pois sem Ele nada seria possível.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1 Aspectos botânicos do gladiolo.....	3
2.2 Cultura de tecidos .....	4
2.2.1 Micropropagação .....	6
a. Cultura de meristemas, gemas e bulbilhos .....	7
b. Cultura de anteras .....	7
2.2.2 Produção e regeneração de calos.....	8
2.2.3 Meios nutritivos .....	9
2.2.4 Reguladores de crescimento.....	10
2.2.5 Carvão ativado .....	12
2.3 Transplântio e aclimatização.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> de gladiolo através de meristemas e gemas axilares.....	17
3.1.1 Efeito de diferentes concentrações do meio MS.....	17
3.1.2 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado .....	18
3.1.3 Efeito de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento BAP em combinação com ANA.....	18
3.1.4 Efeito de concentrações de BAP em combinação com ANA na regeneração de calos .....	18
3.2 Estabelecimento <i>in vitro</i> de gladiolo através de segmentos foliares, pedúnculos florais e anteras imaturas.....	18
3.2.1 Efeito de diferentes concentrações de BAP em combinação com ANA.....	19
3.2.2 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D .....	19
3.2.3 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado .....	19
3.3 Multiplicação dos explantes.....	20
3.3.1 Efeito de diferentes concentrações de BAP em combinação com ANA.....	20
3.3.2 Efeito de diferentes concentrações de TDZ em combinação com ANA.....	20
3.3.3 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado .....	21
3.3.4 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D .....	21
3.4 Enraizamento e pré-aclimatização.....	21

3.4.1 Efeito de diferentes concentrações de ANA para indução de enraizamento.....	21
3.4.2 Efeito da utilização de vermiculita <i>in vitro</i> .....	22
3.5 Aclimatização .....	22
3.5.1 Efeito de diferentes substratos para aclimatização das plântulas de gladiolo.....	22
3.6 Análises Estatísticas.....	22
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
4.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> de gladiolo através de meristemas e gemas axilares.....	24
4.1.1 Meristemas.....	24
4.1.1.1 Efeito de diferentes concentrações do meio MS.....	25
4.1.1.2 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado .....	27
4.1.1.3 Efeito de diferentes concentrações de BAP em combinação com ANA .....	30
4.1.2 Gemas .....	32
4.1.2.1 Efeito de diferentes concentrações do meio MS.....	33
4.1.2.2 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado .....	35
4.1.2.3 Efeito de diferentes concentrações de BAP em combinação com ANA.....	37
4.1.2.4 Efeito de diferentes concentrações de BAP, em combinação com ANA, sobre a regeneração de calos .....	38
4.2 Estabelecimento <i>in vitro</i> de gladiolo através de segmentos foliares, pedúnculos florais e anteras imaturas.....	41
4.3 Multiplicação dos explantes.....	42
4.3.1 Efeito de diferentes concentrações de BAP, em combinação com ANA, sobre a multiplicação de gladiolo.....	43
4.3.2 Efeito de diferentes concentrações de TDZ em combinação com ANA.....	47
4.3.3 Efeito da adição de diferentes concentrações de carvão ativado .....	49
4.3.4 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D .....	51
4.4 Enraizamento e pré-aclimatização.....	53
4.4.1 Efeito de diferentes concentrações de ANA para indução de enraizamento.....	53
4.4.2 Utilização de vermiculita <i>in vitro</i> .....	54
4.5 Aclimatização .....	55
4.5.1 Efeito de diferentes substratos na aclimatização das plântulas de gladiolo.....	55
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>

## RESUMO

SIMÕES, Fernanda Cristiane. **Propagação *in vitro* de gladiolo (*Gladiolus x grandiflorus* L.)**. Lavras: UFLA, 2001. 65p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia)\*

O gladiolo (*Gladiolus x grandiflorus* L.) ou palma de santa rita é uma flor de corte de grande importância comercial. Tendo em vista o crescimento do número de pesquisas visando ao melhoramento genético para produção de novas variedades, aliado ao crescimento das exportações de bulbos, estudos de propagação desta espécie são bastante importantes, sobretudo objetivando aumentar a taxa de multiplicação. O presente trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Lavras, com o objetivo de estabelecer um protocolo eficiente para propagação *in vitro* de gladiolo. Para o estabelecimento *in vitro* foram utilizados, como explantes, meristemas, gemas, segmentos foliares, pedúnculos florais e anteras imaturas, os quais foram cultivados em diferentes concentrações do meio MS e de carvão ativado e dos reguladores de crescimento BAP e ANA, adicionados ao meio de cultura. O melhor desenvolvimento foi observado na utilização de gemas quando se utilizou meio MS na concentração de 125%, sendo formado 1,17 brotos/explante com 1,98 cm/broto, em média. Para multiplicação das plântulas produzidas *in vitro* foi testado o efeito da adição ao meio de cultura de diferentes concentrações de BAP e TDZ em combinação com ANA, carvão ativado e 2,4-D. A utilização de 3,03 mg/L de BAP, em combinação com 0,1 mg/L de ANA, produziu maior número de brotos. A adição de 3,03 g/L de carvão ativado ao meio de cultura promoveu o alongamento dos brotos, formando 3,8 cm/broto, em média. Para o enraizamento e pré-aclimatização foram testadas a adição de ANA ao meio de cultura e a utilização de vermiculita *in vitro*. A maior ocorrência de enraizamento foi observada quando se utilizou 0,1 mg/L de ANA. A utilização de vermiculita *in vitro* em meio MS 50% acrescido de 1g/L de carvão ativado é desejável, pois visualmente promoveu melhor enraizamento nas plântulas. Na fase de aclimatização foram testados os substratos Plantmax, casca de arroz carbonizada e pó de xaxim em todas as combinações, não tendo sido observada diferença entre os tratamentos.

---

\*Comitê de Orientação: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Orientadora); Moacir Pasqual – UFLA (Co-orientador)

## ABSTRACT

SIMÕES, Fernanda Cristiane. *In vitro* propagation of gladiolus (*Gladiolus x grandiflorus* L.). Lavras: UFLA, 2001. 65 p. (Dissertation – Masters of science in phytocny)\*

The gladiolus or palma de Santa Rita is a cut flower of great commercial importance. Having in mind the growth of the number of research works aiming at the genetic improvement for the production of new varieties associated with the growth of exportations of bulbs, studies of propagation of this species are quite important, above all aiming to increase the multiplication rate. The present experiments was developed at the University Federal of Lavras with the objective to establishing an efficient protocol for *in vitro* gladiolus propagation. For *in vitro* establishment was utilized as explants meristems, buds, leaf segments, floral peduncles and immature anthers which were grown at different concentrations of MS medium, activated charcoal and growth regulators BAP and ANA added to the culture medium. The best development was found with in the utilization of buds, cultivated on 125% MS medium, when 1.17 shoots/plant of 1.98 cm/shoot have been formed, on average. For the multiplication of the seedlings produced *in vitro*, the effect of the addition to the culture medium of different concentrations of BAP or TDZ in combination with ANA, activated charcoal and 2.4-D. The utilization of the 3.03 mg/L BAP combined with 0.1 mg/L ANA produced greater number of shoots. The addition of 3.03 g/L of activated charcoal to the culture medium promoted shoot elongation, making up 3.8 cm/shoot, on average. For both rooting and pre-acclimatization, the addition of ANA to the culture medium and *in vitro* utilization of vermiculite were tested. The greatest rooting occurrence was observed when 0.1 mg/L of ANA was utilized. The *in vitro* utilization of vermiculite added on 50% MS medium plus 1g/L of activated charcoal is desirable because visually promoted increased on rooting of the seedlings. To the acclimatization phase were tested the substrates Plantmax, carbonized rice husk, and xaxim powder in all combinations. No differences among the treatments were observed.

---

\*Guidance committee: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva – UFLA (Advisor); Moacir Pasqual – UFLA (Co-Advisor)

# 1 INTRODUÇÃO

A produção de flores, embora presente no mercado brasileiro desde o final do século passado, até meados da década de 1950 ainda não havia adquirido expressão econômica ou tecnológica, sendo uma atividade paralela a outros setores agrícolas.

Atualmente, a floricultura brasileira representa um setor altamente competitivo e exigente na utilização de tecnologias avançadas. Trata-se da segunda atividade que mais cresceu no país e abrange desde o cultivo de plantas ornamentais, flores de corte, plantas envasadas, floríferas ou não, até a produção de sementes, bulbos e mudas de várias espécies, inclusive arbóreas.

O gladiolo, também conhecido como palma ou palma de Santa Rita, é uma das flores de corte mais comuns no mercado, pertencendo ao grupo das plantas herbáceas bulbosas é originário da África do Sul. Tradicionalmente utilizado para ornamentação de túmulos no dia de finados, vem reformulando seu conceito, sendo muito utilizado para decoração dos mais diversos ambientes em ocasiões de maior alegria e contentamento, como datas festivas, casamentos, formaturas, etc. (Paiva et al., 1999).

O gênero *Gladiolus*, pertencente à família Iridaceae, compreende aproximadamente 18 espécies e numerosas cultivares e híbridos de valor comercial como flores de corte. As plantas produtoras de flores grandes, comercialmente disponíveis, pertencem às espécies *Gladiolus x grandiflorus* ou *Gladiolus x hortulanus*. O nome gladiolo é derivado do latim: onde *gladius* significa “espada”, característica atribuída devido à forma de suas folhas. Um nome antigo dado para o gladiolo era “xiphium”, originário do grego, também significando espada.

O gladiolo é propagado vegetativamente por meio de bulbos ou bulbilhos, os quais são produzidos anualmente, obtidos de gemas axilares do

bulbo plantado (Rees, 1992).

Por meio de práticas convencionais de propagação, o número de bulbos-filhos produzidos por bulbo-mãe no período de um ano é pequeno, levando cerca de oito a dez anos para se obter um clone que tenha porte suficiente para fins comerciais. Devido à importância comercial dos gladiolos, é desejável acelerar a taxa de multiplicação para propagação em larga escala e utilizando-se a propagação *in vitro*, esse período de tempo pode ser sensivelmente reduzido. A utilização da técnica de micropropagação *in vitro* partindo de cultura de meristemas pode ser uma importante alternativa para obtenção de um grande número de mudas com alta qualidade, com vista a sua utilização em programas de melhoramento visando, por exemplo, resistência à fusariose (Pena et al., 1999). Além disso, com o crescimento das exportações de bulbo de gladiolo, é desejável acelerar a taxa de multiplicação, por meio da propagação *in vitro*, para obtenção de um maior número de plantas.

Embora a pesquisa com gladiolo tenha sido iniciada há duas décadas e muito progresso tenha sido alcançado, a regeneração de plantas partindo de cultura de calos, assim como o aumento do número de plantas produzidas, são ainda problemas que impedem a aplicação de métodos de cultura de tecidos para a propagação em massa e a exploração pela indústria de flores. Estudos básicos sobre os vários fatores que influenciam a regeneração são necessários para que o método seja desenvolvido de forma a propiciar material suficiente para plantio de campo e propagação em larga escala (Bajaj, Sidhu e Gill, 1992).

Objetivou-se desenvolver uma metodologia eficiente para a propagação *in vitro* de gladiolo, produzindo novas plantas em um período reduzido de tempo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos botânicos do gladiolo

(O gladiolo é uma planta bulbosa de clima tropical e subtropical, originária do continente africano. Possui folhas lanceoladas, caule denominado de escapo e inflorescência do tipo espiga floral. Número, tamanho e cor das flores são variáveis de acordo com a espécie ou cultivar. Possui bulbo sólido denominado de corno e suas raízes são fasciculadas, ocorrendo em grande número.)

É uma planta da família botânica Iridaceae, subfamília Ixioidea, envolvendo entre 250 e 300 espécies (Rees, 1992). O híbrido *Gladiolus x grandiflorus* L. é o principal representante do gênero, apresentando diferentes formas, cores ou variedades botânicas (Rees, 1992; Wilfret, 1992; Joly, 1993).

A cultura do gladiolo tem elevada importância econômica na horticultura ornamental, sendo o terceiro produto em volume de vendas dentre as flores de corte cultivadas no Brasil.

A propagação, embora possa ser realizada por meio de sementes, é essencialmente vegetativa, através de coleta de bulbilhos e bulbos formados no bulbo-mãe. Esta constitui a principal técnica de reprodução comercial de gladiolo. A propagação por meio de sementes é utilizada somente em programas de melhoramento genético e para a obtenção de híbridos (Salinger, 1991).

Segundo Crockett (1977) e Salinger (1991), o bulbo-sólido, ou corno, é a estrutura do caule que possui a base intumescida, com o acúmulo de nutrientes de reserva envolto em restos foliares secos com aparência de escamas, apresentando nós e entrenós bem marcados e evidentes. A parte mais importante do bulbo consiste de um tecido de reserva formado de células do parênquima. Seu ápice possui uma gema vegetativa que se desenvolve em folhas e flores.

## 2.2 Cultura de tecidos

O processo de cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou um órgão) é isolado sob condições assépticas, em meio nutritivo artificial. Este processo baseia-se no princípio da totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula do organismo vegetal apresenta todas as informações genéticas necessárias à regeneração de uma planta completa (Gallo e Crocomo, 1995; Pasqual, Hoffmann e Ramos, 1997).

A propagação de espécies vegetais *in vitro* apresenta vantagens em relação aos métodos convencionais, como a propagação de clones em qualquer época do ano, propagação de espécies que dificilmente seriam propagadas por métodos convencionais, rápida multiplicação clonal de espécies raras, além da importância na eliminação de vírus (Gallo e Crocomo, 1995). Dependendo da finalidade da propagação, conforme descrito por Murashige (1974), a cultura de tecidos de plantas pode ser feita utilizando como propágulo inicial tecidos meristemáticos (gemmas axilares, regiões apicais e o meristema propriamente dito) e/ou explantes não meristemáticos (pecíolo, pedúnculos e o limbo foliar). No processo de regeneração de órgãos e tecidos, as dicotiledôneas têm demonstrado maior adaptação para o cultivo *in vitro* em relação às monocotiledôneas (Wilfret, 1971).

A cultura de tecidos proporcionou um método de desenvolvimento de células isoladas, tecidos e órgãos sob condições estéreis, aumentando rapidamente o número de plantas de uma determinada espécie ou ainda servindo como objeto de estudo para outras áreas. Esta técnica vem sendo utilizada com sucesso para a obtenção de mudas saudáveis, em grande número, de espécies economicamente importantes ou com dificuldade de propagação, realizando avanços importantes nos campos de genética, fisiologia e patologia (Paiva,

1998).

Segundo Ventura, Zambolim e Chaves (1993) e Ventura (1994), a utilização da técnica de micropropagação é uma alternativa viável para a obtenção de materiais vegetativos uniformes em grande quantidade e livres de enfermidades. Em consequência disso, a cultura de tecidos de plantas tem sido utilizada como um meio rápido para a propagação vegetativa na indústria de horticultura ornamental, sendo explorada comercialmente para um grande número de espécies vegetais (Holgate, 1977; Chu, 1985).

Com o aumento do consumo de flores de corte na Europa, assim como a exportação mundial deste produto, cresceu a demanda por produtos de cultura de tecidos (van Doesburg, 1989, citado por Jones e Sluis, 1991). A cultura de tecidos ou clonagem de meristemas tem sido utilizada para propagação de vários gêneros como orquídea, lírio, cacto, violeta africana, banana ornamental e begônia (Anderton e Park, 1989). Porém, podem haver diferenças de regeneração de plantas propagadas *in vitro*, de acordo com a cultivar a ser utilizada para a micropropagação.

Utilizando-se práticas convencionais, o número de bulbos-filhos produzidos por um bulbo-mãe no período de um ano é pequeno. São necessários de 8 a 10 anos para se produzir um clone que atinja o tamanho adequado para propósitos comerciais. Todavia, utilizando-se o método *in vitro*, esse tempo pode ser reduzido para dois anos (Reinert e Bajaj, 1977; Wilfret, 1971).

Em pesquisa para gladiolo, a cultura de tecidos pode ser utilizada com diversas finalidades. Por exemplo, a multiplicação rápida de um genótipo específico poderia facilitar bastante um programa de melhoramento. Com os métodos atuais de propagação, 5 a 7 anos são necessários para a seleção inicial de uma plântula de gladiolo até que haja um suplemento suficiente de bulbos para fornecimento comercial (Wilfret, 1971).

É altamente desejável uma elevada taxa de multiplicação para produção

em larga escala de gladiolo, devido à sua importância comercial, já que o desenvolvimento de bulbos é lento, e conseqüentemente, a produção de novas mudas. A cultura de tecidos apresenta-se, então, como uma alternativa para possibilitar a aceleração da multiplicação com eficiência, evitando os problemas normalmente encontrados nos métodos tradicionais de propagação.

### **2.2.1 Micropropagação**

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação devido ao tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e a de maior impacto (Grattapaglia e Machado, 1998).

Os primeiros experimentos de cultivo *in vitro* de gladiolo foram realizados por Ziv, Halevy e Shilo (1970), que cultivaram explantes retirados da haste da inflorescência em meio MS contendo 1,0 mg/L de ANA e 0,5 mg/L de cinetina, obtiveram calos, gemas e bulbilhos. Os calos produzidos regeneraram plantas completas.

Segundo Rees (1992), o gladiolo e seus híbridos podem ser regenerados partindo de explantes de brotos axilares, com uma taxa de multiplicação de 3 a 5 novos brotos a cada 6 a 8 semanas, em subcultura seriada. As plântulas, no meio de cultura, produzem bulbilhos que podem ainda multiplicar-se contribuindo para a propagação de plantas em larga escala.

Na micropropagação, diversas estruturas podem ser utilizadas para o estabelecimento *in vitro* de gladiolos, como meristemas, gemas, segmentos foliares, anteras imaturas, inflorescências, haste de caule, flor desnudada e brácteas.

### **a. Cultura de meristemas, gemas e bulbilhos**

Po meio da propagação *in vitro* de meristemas é possível obter materiais vegetativos livres de patógenos, com redução no tempo de obtenção de plântulas para o cultivo (Batista, 1996). O cultivo de meristemas tem sido utilizado também com o objetivo de superar o problema de contaminação patogênica de propágulos, tendo êxito em programas para propagação e multiplicação de material sadio de outras espécies, além de auxiliar o intercâmbio e melhoramento genético (Crisp e Walkey, 1974; Souza, 1988; Grattapaglia e Machado, 1990).

Os meristemas e gemas são materiais mais prontamente disponíveis, exigindo menos tempo para obtenção das plântulas em relação ao uso de outros tipos de explantes (Wilfret, 1971).

Bajaj, Sidhu e Gill (1992), cultivando bulbilhos de gladiolo, obtiveram formação de plantas as quais, após total desenvolvimento, apresentaram bulbificação. Em alguns explantes, brotos múltiplos foram também formados.

### **b. Cultura de anteras**

Por meio da cultura *in vitro* de anteras e micrósporos podem ser obtidos haplóides androgenéticos. A obtenção de plantas pode ocorrer por embriogênese ou organogênese, esta passando pela formação de calos nas anteras (Peters, Bobrowski e Rosinha, 1999).

A cultura de anteras desenvolvida por Guha e Maheshwari (1964) já foi empregada para a obtenção de calos, embrióides e plantas em mais de 247 espécies, 88 gêneros e 34 famílias.

Embora ocorra baixa produção de embrióides pela cultura de anteras utilizando meio líquido e/ou sólido, em algumas espécies, como o fumo, o

crescimento e a sobrevivência dos embriões/calos são estimulados pela adição de uma mistura diluída de sais minerais, uma fonte de carbono, vitaminas e, dependendo da espécie, de substâncias reguladoras de crescimento. A mistura de sais mais indicada para a cultura de anteras é o meio proposto por Murashige e Skoog (1962). Em muitas espécies, o crescimento e desenvolvimento dos embriões/calos são influenciados pelas concentrações dos sais minerais, especialmente do nitrogênio (Peters, Bobrowski e Rosinha, 1999).

Segundo Bajaj, Sidhu e Gill (1992), o crescimento *in vitro* das anteras de gladiolo variou com o estágio de desenvolvimento destas. As anteras de tamanho médio cultivadas em meio MS acrescido de 0,5 mg/L de 2,4-D, 5% de água de coco e 0,1 mg/L cinetina, desenvolveram estrutura semelhante a folhas. Anteras em estágio de maturação mais avançado, alongaram consideravelmente e desenvolveram calos e raízes.

### **2.2.2 Produção e regeneração de calos**

Simonsen e Hildebrandt (1971) descreveram o processo de produção de plântulas de gladiolo através de culturas de calos derivados de extremidades de haste de bulbo. Gemas apicais dos bulbilhos isoladas em meio MS foram a melhor fonte para formação de calos, comparando com tecidos de outras partes dos bulbilhos ou de raízes e caules. Ao contrário, Bajaj, Sidhu e Gill (1982) estudaram o efeito de vários fatores na propagação *in vitro* de gladiolos. De todos os explantes (inflorescências, haste de caule, flor desnudada, brácteas e segmentos foliares) e meios testados, a melhor formação de calos foi obtida da haste floral, utilizando ANA. Os reguladores de crescimento desempenharam um papel importante na morfogênese e na formação de bulbos.

As extremidades de caules de bulbilhos de diferentes cultivares variaram em sua capacidade de formar calos. Meios líquidos proporcionaram resultados

inferiores aos meios de ágar para produção de calos. Wilfret (1971), Hussey (1977) e Bajaj, Sidhu e Gill (1982) conseguiram eficiente regeneração das plantas de gladiolos através de cultura de calos. O calo estabelecido por Bajaj, Sidhu e Gill (1992), partindo de vários segmentos, regenerou novas plantas.

A organogênese em calos de alho foi obtida após supressão da auxina indutora da calogênese. O processo organogênico foi iniciado quando os calos foram transferidos para meio com baixa ou nenhuma quantidade de regulador de crescimento e suplementado com citocinina. Para obtenção de embriões somáticos partindo de calos de alho, além da omissão do uso de 2,4-D, houve exigência de um perfeito balanço entre auxina e citocinina (Havranek e Novak, 1973; Novak, Havel e Dolezel, 1986; Abo El-Nil, 1977).

### **2.2.3 Meios nutritivos**

Uma das principais propriedades do meio de cultura artificial, utilizado como substrato na cultura de tecidos, é a de suprir os nutrientes necessários para o crescimento dos explantes (Paiva, 1998). As citações do meio MS, por exemplo, normalmente se referem à composição dos sais minerais do meio de Murashige e Skoog (1962), que pode ser identificado como um meio básico. Quando as combinações de vitaminas não são mencionadas, pode-se supor que foram utilizadas também as vitaminas em concentrações propostas no meio MS.

O meio desenvolvido por Murashige e Skoog (1962) objetivava o cultivo de calos de tabaco, mas, apesar disso, atualmente, tem sido utilizado para desenvolvimento *in vitro* de diversas espécies e diferentes métodos de propagação (George, 1996). A concentração dos nutrientes do meio MS é geralmente considerada elevada e, devido a tal característica, muitas modificações têm sido estudadas com o objetivo de reduzir os níveis dos nutrientes, permitindo assim maior adaptação dos cultivos *in vitro* (Pierik, 1987;

Samartin, 1989).

Os meios nutritivos utilizados para cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Complementando as substâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados ao meio para suprirem as suas necessidades metabólicas, energéticas e estruturais (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998).

No desenvolvimento dos meios nutritivos para a cultura de tecidos de plantas, houve, desde o início, uma procura de meios definidos, de composição conhecida e controlada. Assim, torna-se possível a reprodução dos resultados em qualquer época ou lugar. Para evitar a contaminação dos meios por impurezas minerais, todos os sais utilizados na sua preparação devem ser de boa qualidade analítica (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998).

De acordo com Barbosa et al. (1993), os melhores resultados quanto à taxa de multiplicação de gérbera foram obtidos em meio com metade das concentrações de sais do MS e suplementado com 2,0 mg/L de BAP e com período de subcultivo de 20 dias. Para o cultivo *in vitro* de estrelicia, as diferentes concentrações do meio MS não alteraram o desenvolvimento dos embriões (Paiva, 1998). De acordo com Simões, Paiva e Rodrigues (1999), o meio MS na concentração 50% promoveu maior crescimento dos brotos em meristemas de orquídeas.

#### **2.2.4 Reguladores de crescimento**

O crescimento e a morfogênese são controlados pela interação e balanço entre os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura e as substâncias de crescimento endógenas do explante. As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de

tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calos em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores de crescimento (Skoog e Miller, 1957).

A adição de citocinina é favorável ou até necessária. As citocininas são utilizadas em cultura de tecidos para estimularem a divisão celular e atuam, conseqüentemente, no processo de morfogênese (George, 1996). Das citocininas comercialmente disponíveis, o BAP (6-benzilaminopurina) é a que, geralmente, proporciona melhores resultados (Grattapaglia e Machado, 1998). O BAP é uma citocinina sintética muito utilizada devido à sua efetividade e baixo custo em relação às outras (Krikorian, 1991). O BAP induz à formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação (Hu e Wang, 1983). As concentrações de citocinina podem variar bastante em função da espécie e do tipo de explante. Meios com 0,05 a 1,0 mg/L de BAP têm sido utilizados com bons resultados para o cultivo de ápices caulinares de várias espécies herbáceas e lenhosas (Grattapaglia e Machado, 1998).

De acordo com Hussey (1977), a adição de BAP ao meio de cultura impediu a dormência e promoveu o crescimento de brotos, além de inibir o crescimento de raízes em gladiolos. Estes efeitos foram acompanhados por um desenvolvimento precoce dos brotos axilares que formaram plântulas *in vitro*, as quais puderam ser subcultivadas em série, proporcionando maior proliferação.

A utilização de TDZ (Thidiazuron) em meio de cultura foi relatada inicialmente por Nielsen, Hansen e Brandt (1995). Nieuwkerk, Zimmerman e Fordham (1986) verificaram que o TDZ estimulou a multiplicação de partes aéreas de macieira em concentrações bem inferiores às de BAP. Zhou et al. (1994) utilizaram TDZ em combinação com 2,4-D para embriogênese somática de *Cayratia japonica*. As observações permitiram identificar a ação do TDZ que, segundo estes autores, estimulou o desenvolvimento dos meristemas e a formação de gemas *in vitro*, havendo ainda uma otimização do balanço de

citocinina. O TDZ estimulou a ação das citocininas e aumentou o sinergismo com as auxinas 2,4-D e ANA.

Várias auxinas (ANA, AIA, AIB, 2,4-D, entre outras) têm proporcionado respostas diferentes *in vitro* (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998). As auxinas podem ser necessárias para complementar o teor endógeno ou suprir as necessidades de meristemas isolados (Smith e Murashige, 1970). A concentração mais baixa de ANA (ácido naftalenoacético), 0,5 mg/L, em combinação com cinetina, não induziu calos em nenhum dos explantes cultivados de gladiolo, sendo necessária uma alta concentração de ANA (10 ml/L) para a formação de calos e diferenciação de raízes. Todavia, segundo Bajaj, Sidhu e Gill (1982), os explantes retirados da extremidade distal da inflorescência mostraram uma melhor resposta em relação aos obtidos de regiões proximais. Estes resultados foram atribuídos à possível presença de reguladores endógenos de crescimento nesta área.

Nem sempre é benéfica a aplicação de fitorreguladores imediatamente após o isolamento do explante da planta-matriz. Eles podem estimular respostas indesejadas, como a formação de calo e eventualmente intoxicar os tecidos (Grattapaglia e Machado, 1998).

### **2.2.5 Carvão ativado**

O carvão ativado, quando adicionado ao meio de cultura, possui as funções de escurecer o meio, impedindo a incidência de luz na base do explante, reduzindo a ocorrência de oxidação e adsorvendo os compostos tóxicos presentes no ágar (Kohlenbach e Wernicke, 1978; Tisserat, 1982) ou os formados durante a oxidação dos compostos fenólicos (Fridborg et al., 1978). Já se identificou também a sua eficiência para estimular o enraizamento e restaurar a capacidade embriogênica. Geralmente, o carvão ativado é utilizado em meios

nutritivos em concentrações que variam entre 0,5 e 2,0 g/L (Tilquin, 1979; Fridborg e Eriksson, 1975).

O carvão ativado tem sido um coadjuvante útil para a propagação *in vitro* por causa da sua capacidade de reter concentrações excessivas de fitoreguladores e compostos tóxicos que inibem a morfogênese (Boulay, 1984; Fridborg et al., 1978).

### 2.3 Transplântio e aclimatização

O transplântio e o estabelecimento de plantas assepticamente propagadas sob condições não assépticas são ainda os principais problemas para o processo de propagação via cultura de tecidos de muitas espécies. A transferência de plântulas produzidas por meio da bulbificação *in vitro* para o solo foi descrita por Ziv (1979), resultando em uma porcentagem muito baixa de plantas estabelecidas.

O sucesso da sobrevivência das plântulas produzidas *in vitro* depende em grande parte da formação de um bom sistema radicular. Em trabalhos realizados por Ziv (1979), a adição de 0,3% de carvão ativado ao meio de pré-transplântio melhorou o crescimento das raízes de gladiolo e, após o transplântio, a taxa de sobrevivência também foi aumentada.

Substratos inertes, como a vermiculita, a perlita ou espumas de poliuretano utilizadas para arranjos florais, embebidos com meio líquido, podem ser alternativas mais baratas do que o ágar. Zimmermam e Broome (1979) utilizaram a mistura vermiculita, perlita e areia para o enraizamento de diversas variedades de macieiras, com resultados superiores aos do cultivo em meio com ágar, nesta fase de enraizamento e pré-aclimatização. Em comparação ao sistema de cultivo em ágar, houve uma melhoria na ramificação do sistema radicular de amora (*Rubus idaeus*) em um de três tipos de espuma, testados por

Gebhardt (1985). A utilização de vermiculita, em vez de ágar, enriquecida com MS líquido (50%) e suplementado com ANA e carvão vegetal ativado, promoveu bom desenvolvimento radicular (Logan e Zetter, 1985). O aumento no nível de auxina no meio de cultura promoveu desenvolvimento de raízes e maior porcentagem de sobrevivência após o transplântio para condições não assépticas (Ziv, 1979).

A aclimatização consiste em retirar a planta da condição *in vitro* e transferi-la para a casa de vegetação. O objetivo é superar as dificuldades que as plântulas obtidas por cultura de tecidos enfrentam quando são removidas dos tubos de ensaio, ou seja, temperatura, luminosidade, irrigação e nutrientes em condições não controladas e presença de microrganismos (Gratapaglia e Machado, 1990).

Dentre os fatores que influenciam a aclimatização, destaca-se o substrato, por sua atuação na qualidade do produto final e nos custos de produção (Grolli, 1991). O substrato deve ser de baixa densidade e rico em nutrientes, ter composição química equilibrada e física uniformes, elevada CTC, alta capacidade de retenção de água, aeração e drenagem, boa coesão entre as partículas ou aderência junto às raízes e ser preferencialmente estéril às plantas daninhas e com boa flora bacteriana (Coutinho e Carvalho, 1983). Takeyoshi et al. (1984), trabalhando com estacas em fase de aclimatização de *Crysanthemum morefolium* L. cv. Polaris, obtiveram 99% de enraizamento quando utilizaram como substrato casca de arroz carbonizada. Jung e Kampf (1986) obtiveram melhores índices de pegamento de mudas de amor-perfeito, cravo-de-defunto e flor-de-mel utilizando casca de arroz carbonizada em comparação com areia.

Com o aperfeiçoamento da tecnologia *in vitro* e a manipulação de meios, explantes e condições de cultura, Bajaj, Sidhu e Gill (1982) e Lilien-Kipnis e Kochba, (1987) conseguiram propagar gladiolos em larga escala e aumentar a produção de bulbilhos.

Embora nos trabalhos com gladiolos muito progresso já tenha sido alcançado, como a regeneração de plantas partindo de cultura de meristemas e também o aumento do número de plantas por bulbo, ainda existem problemas que impedem a aplicação de métodos de cultura de tecidos para a propagação em grande quantidade e exploração pela indústria de flores. Contudo, trabalhos básicos sobre vários fatores que influenciam a regeneração ainda são necessários antes que o método seja desenvolvido para proporcionar material suficiente para o plantio em campo (Bajaj, Sidhu e Gill, 1992).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Casa de Vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Para os experimentos foi utilizada a variedade de gladiolo (*Gladiolus x grandiflorus* L.) White Friendship, bastante utilizada pela sua precocidade e por produzir inflorescência branca.) Para o estabelecimento *in vitro*, foram usados como explantes gemas, meristemas, anteras, segmentos do pedúnculo floral e segmentos foliares.

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige e Skoog, 1962), cujos componentes constam do Quadro 1.

QUADRO 1. Componentes do meio MS.

Componentes	Concentração (mg/L)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,000
KNO <sub>3</sub>	1900,000
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200
KN <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,000
KI	0,830
NO <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,250
CoCL <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,025
CaCL <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440,000
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370,000
MnSo <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	22,300
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8,600
CuSo <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,025
NA <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,250
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27,850
Tiamina-HCL	0,500
Ac. Nicotico	0,500
Piridoxina	0,500
Glicina	2,000

### **3.1 Estabelecimento *in vitro* de gladiolo através de meristemas e gemas axilares**

Os bulbos de gladiolo foram mantidos no escuro, em temperatura ambiente, para que houvesse emissão de brotações. Após a retirada da casca, os bulbos foram submetidos à desinfestação em água sanitária (produto comercial) 50% por 15 minutos e a seguir foram lavados em água corrente. Destes, retiraram-se os brotos formados, dos quais se extraíram os meristemas e as gemas. Estes foram novamente submetidos a desinfestação em etanol por 5 minutos e, em seguida, em água sanitária 50% por 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar realizou-se triplice lavagem em água destilada autoclavada. As gemas e meristemas foram extraídos e transferidos para tubos de ensaio contendo 10 ml do meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) acrescido dos tratamentos, além de 30 g/L de sacarose e 7 g/L de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes de ser autoclavado a 121°C, sob pressão de 1 atm por 20 minutos. O material inoculado foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura de 26°C ± 1°C.

Todos os experimentos foram instalados em delineamento estatístico inteiramente casualizado com doze repetições e um tubo por parcela. As avaliações foram realizadas sessenta dias após a instalação dos experimentos, observando o número e comprimento de brotos, ocorrência de calos e raízes.

#### **3.1.1 Efeito de diferentes concentrações do meio MS**

O meio MS foi testado nas concentrações 25%, 50%, 75%, 100% e 125% dos seus sais.

### **3.1.2 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado**

Ao meio de cultura MS 100% se adicionou carvão ativado nas concentrações 0; 0,5; 1,0 e 2,0 g/L.

### **3.1.3 Efeito de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento BAP em combinação com ANA**

Avaliou-se o efeito da adição dos reguladores de crescimento BAP nas concentrações 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L e ANA, nos níveis 0; 0,1 e 1,0 mg/L, em todas as combinações possíveis, constituindo um esquema fatorial.

### **3.1.4 Efeito de diferentes concentrações de BAP em combinação com ANA na regeneração de calos**

Os calos formados no experimento anterior (3.1.3) foram transferidos para um novo experimento, com o objetivo de avaliar a sua regeneração. Testou-se o efeito de BAP e ANA nas concentrações: 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 e 0; 0,1 e 1,0 mg/L, respectivamente, em todas as combinações possíveis, formando esquema fatorial.

## **3.2 Estabelecimento *in vitro* de gladiolo através de segmentos foliares, pedúnculos florais e anteras imaturas**

Para o estabelecimento *in vitro* de gladiolo foram coletadas folhas jovens, pedúnculos florais e anteras imaturas. Estas foram submetidas a assepsia, constituída de lavagem em etanol por 5 minutos, e em seguida, em solução de água sanitária (produto comercial) 30% por 15 minutos. O material foi então levado para a câmara de fluxo laminar, onde se realizou uma triplice lavagem em água destilada e autoclavada. As folhas foram seccionadas em segmentos de

1,0 cm<sup>2</sup> e os pedúnculos em segmentos de 1,0 cm de largura, os quais foram acondicionados em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura acrescido dos tratamentos. O meio de cultura utilizado foi o MS, acrescido de 30 g/L de sacarose e 7 g/L de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 e, a seguir, autoclavou-se a 121°C, sob pressão de 1 atm por 20 minutos. Após a inoculação, o material foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura de 26°C ± 1°C. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições e três tubos por parcela. As avaliações foram realizadas 60 dias após a instalação dos experimentos, observando-se a ocorrência de brotações, raízes ou calos.

### **3.2.1 Efeito de diferentes concentrações de BAP em combinação com ANA**

Neste experimento, adicionou-se ao meio de cultura BAP nas concentrações: 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L, em todas as combinações possíveis com ANA nos níveis 0; 0,1 e 1,0 mg/L, em esquema fatorial 5x3.

### **3.2.2 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D**

Ao meio de cultura MS acrescentou-se 2,4-D nas concentrações 0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L.

### **3.2.3 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado**

Adicionou-se ao meio de cultura MS, carvão ativado nas concentrações 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 g/L.

### **3.3 Multiplicação dos explantes**

Os brotos que foram produzidos *in vitro*, nos experimentos anteriores, foram submetidos a experimentos, com o objetivo de identificar o melhor meio para proliferação. O meio de cultura básico utilizado foi também o MS acrescido de 30 g/L de sacarose e 7 g/L de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes de ser autoclavado a 121°C, sob pressão de 1 atm por 20 minutos. Após a repicagem, o material foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura de 26°C ± 1°C. Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado com doze repetições e um tubo por parcela. As avaliações foram realizadas sessenta dias após a instalação dos experimentos, sendo observado número e comprimento de brotos, diâmetro de bulbo e ocorrência de calos e raízes.

#### **3.3.1 Efeito de diferentes concentrações de BAP em combinação com ANA**

Testou-se, no experimento, o efeito da adição das concentrações de 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L de BAP e 0; 0,1 e 1,0 mg/L de ANA, ao meio de cultura MS, em todas as combinações possíveis, em esquema fatorial 5x3.

#### **3.3.2 Efeito de diferentes concentrações de TDZ em combinação com ANA**

Foram acrescidos ao meio de cultura MS TDZ nas concentrações: 0; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L e ANA 0; 0,1 e 1,0 mg/L, em todas as combinações possíveis, formando um esquema fatorial 5x3.

### **3.3.3 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado**

Ao meio de cultura MS, foram acrescentadas as seguintes concentrações de carvão ativado: 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 g/L.

### **3.3.4 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D**

Adicionou-se ao meio de cultura MS, 2,4-D nas concentrações: 0; 0,1; 0,5; 1,0; e 2,0 mg/L.

## **3.4 Enraizamento e pré-aclimatização**

As plântulas produzidas *in vitro* foram submetidas a experimentos visando identificar o melhor meio de enraizamento. Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura de 26°C. As avaliações foram realizadas sessenta dias após a instalação dos experimentos, observando-se a formação de raízes.

### **3.4.1 Efeito de diferentes concentrações de ANA para indução de enraizamento**

Foram utilizadas neste experimento diferentes concentrações de ANA (0; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L) adicionadas ao meio de cultura, em que foram inoculadas as plântulas produzidas na fase de multiplicação. O meio de cultura básico utilizado foi o MS, acrescido de 30 g/L de sacarose e 7 g/L de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes de ser autoclavado a 121°C, sob pressão de 1 atm por 20 minutos. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com 12 repetições.

### **3.4.2 Efeito da utilização de vermiculita *in vitro***

No processo de pré-aclimatização, o material foi transferido para tubos de ensaio contendo meio MS 50% suplementado com 1g/L de carvão ativado, vermiculita e 30 g/L de sacarose, conforme metodologia descrita por Logan e Zetter (1985). O pH foi ajustado para 5,8 antes de ser autoclavado a 121°C, sob pressão de 1 atm por 20 minutos. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com 12 repetições.

### **3.5 Aclimatização**

#### **3.5.1 Efeito de diferentes substratos na aclimatização das plântulas de gladiolo**

Para a aclimatização das plantas, testou-se o efeito de diferentes substratos, visando identificar a melhor combinação para a sobrevivência e desenvolvimento das mudas aclimatadas. Os substratos utilizados foram Plantimax, casca de arroz carbonizada e pó de xaxim em iguais proporções, em todas as combinações possíveis. As mudas permaneceram em bandejas de isopor com 72 células, em casa de vegetação, cobertas com sombrite e recebendo a irrigação através de nebulização, por trinta dias.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições. As avaliações foram realizadas trinta dias após o estabelecimento, analisando-se altura da planta, diâmetro do bulbo formado e comprimento das raízes.

### 3.6 Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos experimentos foram realizadas utilizando-se procedimentos não-paramétricos, pelo fato de a distribuição dos resíduos do modelo não seguir a distribuição normal de probabilidade e ter sido baseada em características qualitativas por meio de nota. Como o delineamento empregado em todos os experimentos foi inteiramente casualizado, o teste de igualdade entre tratamentos utilizado foi o de Kruskal-Wallis, o qual é apropriado para este tipo de delineamento (Campos, 1983). Nos experimentos em que se testaram mais de dez tratamentos, foi utilizada uma aproximação desse teste pelo do teste de qui-quadrado, utilizando o sistema SAS® (SAS® Institute, 1989).

Para as características ocorrência de calos e raízes foram atribuídas notas para as avaliações. Quando foi observada a ocorrência de calos e raízes, foi destinada a nota 1 e na sua ausência a nota 0.

Nos experimentos em que o teste em questão foi significativo, foi utilizado o teste de regressão. Como em alguns experimentos os tratamentos estavam arranjados em estrutura fatorial com dois fatores, optou-se pelo desdobramento da interação entre fatores (cada interação do fatorial passou a corresponder a um tratamento). Devido à ocorrência de um coeficiente de variação (CV) muito alto, todas as análises de regressão sofreram transformação de dados através da equação:  $\sqrt{x+1}$ . Para os resultados foram utilizados os dados transformados. As análises de regressões foram feitas utilizando o sistema SISVAR® (Ferreira, 1999).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estabelecimento *in vitro* de gladiolo através de meristemas e gemas axilares

#### 4.1.1 Meristemas

Na Tabela 1 encontram-se os resultados obtidos nos experimentos de estabelecimento *in vitro* de gladiolo através de meristemas. Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações do meio MS, da adição de carvão ativado ao meio de cultura e dos reguladores de crescimento BAP e ANA.

TABELA 1. Valores de significância, conforme o critério de Kruskal-Wallis, para testar a hipótese de igualdade entre os tratamentos dos diferentes experimentos, em função das características número e comprimento de brotos, ocorrência de calos e raízes, no estabelecimento *in vitro* de gladiolo pela cultura de meristemas. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Experimentos	Número de brotos	Comprimento de brotos	Ocorrência de calos	Ocorrência de raízes
Concentrações de MS	0,1968	0,2023	-	0,1381
Concentrações de carvão ativado	0,1870	0,1542	0,1264	0,0545
BAP x ANA	0,001*	0,001*	0,0006*	-

\* Significativo a 1% de probabilidade

Observa-se na Tabela 1 que no experimento em que se avaliou o comportamento dos meristemas em diferentes concentrações do meio MS, não houve diferença entre os tratamentos testados para as características observadas. Nestes tratamentos também não foi observado formação de calos.

Nos tratamentos em que se testou o efeito da adição ao meio de cultura de diferentes concentrações de carvão ativado, também não foi possível detectar diferença para característica alguma. Além da formação de brotos, houve presença de calos, mas também detectando diferença não significativa entre as concentrações testadas. No desenvolvimento dos meristemas em meio MS acrescido de concentrações de BAP em combinação com ANA, se observou diferença significativa entre os tratamentos para as características número e comprimento de brotos e ocorrência de calos. Não se obteve formação de raízes.

#### **4.1.1.1 Efeito de diferentes concentrações do meio MS**

As diferentes concentrações de MS não influenciaram o desenvolvimento dos meristemas. Observa-se, na Figura 1A, que nas concentrações 50%, 75%, 100% e 125% do meio MS houve formação média de 0,21 a 0,36 brotos/explante, sendo que na concentração 25% não ocorreu brotação. Não foi possível determinar uma concentração ótima do meio MS para o desenvolvimento dos meristemas, pois a produção média de brotos não diferiu entre os tratamentos testados. Estes resultados concordam com os de Paiva (1998), que também não observou alterações no desenvolvimento dos embriões de estrelicia utilizando diferentes concentrações do meio MS.

Apesar de não ter sido detectada diferença entre estes resultados, na Figura 1B observa-se que houve aumento crescente do comprimento dos brotos, à medida que se elevaram as concentrações do meio MS. O comprimento dos brotos formados variou de 0,7 a 1,77 cm.

Na Figura 1C observa-se a ocorrência de raízes em todos os brotos formados, porém, com maior frequência nos meios com 75% e 125% da concentração dos sais do meio MS. Contudo, as raízes desenvolvidas eram

pequenas e em quantidade reduzida.

A redução das concentrações do meio MS até 50% aparentemente não alterou o desenvolvimento dos brotos. Assim, é possível diminuir custos reduzindo a quantidade de sais do meio de cultura sem prejuízos na formação de brotos. A redução para 25% do meio MS não é recomendada, pois houve inibição do desenvolvimento dos meristemas.

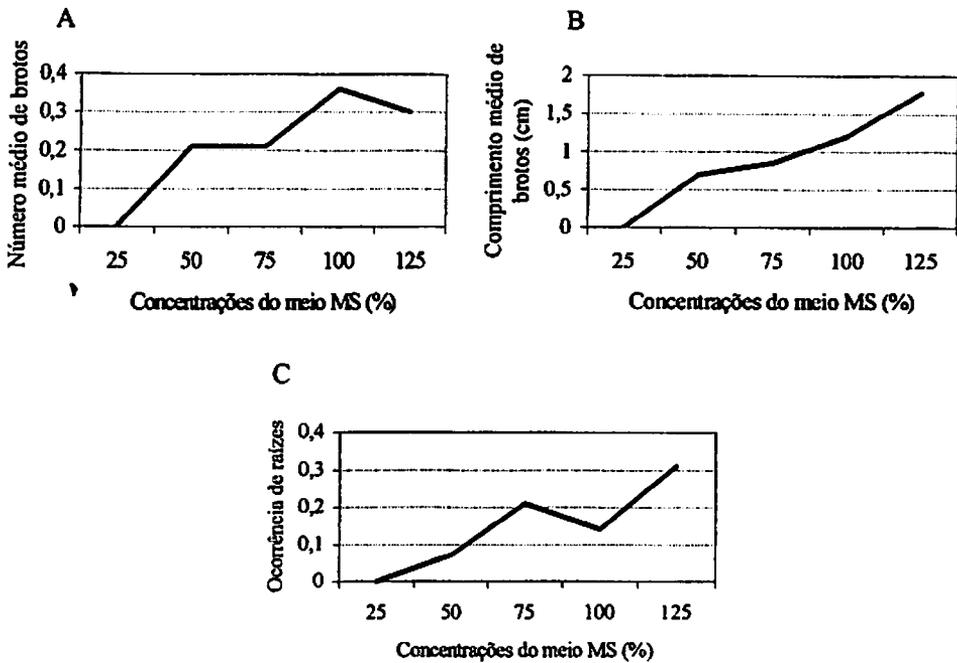


FIGURA 1. Número médio de brotos (A), comprimento médio de brotos (B) e ocorrência de raízes (C) formados em meristemas de gladiolo cultivados em diferentes concentrações do meio MS. UFLA, Lavras/MG, 1999.

As porcentagens de brotações formadas em meristemas cultivadas em diferentes concentrações do meio MS estão representadas na Figura 2.

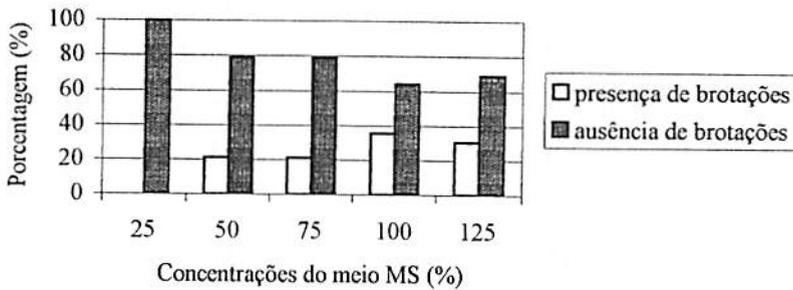


FIGURA 2. Porcentagem de brotações formadas em meristemas de gladiolo cultivados em diferentes concentrações do meio MS. UFLA, Lavras/MG, 1999.

#### 4.1.1.2 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado

O número e comprimento de brotos e a ocorrência de calos e raízes formados pelo desenvolvimento dos meristemas cultivados em carvão ativado não foram influenciados pelas diferentes concentrações testadas. O número de brotos formado foi pequeno, correspondendo apenas ao desenvolvimento dos meristemas. À medida que aumentaram as concentrações de carvão ativado, houve pequeno incremento no número de brotos formados dos meristemas de gladiolo. Observa-se na Figura 3 (A) que nos meios onde se utilizou 0,5 a 2,0 g/L de carvão ativado, houve formação média de 0,7 a 0,9 brotos/explante, enquanto que no meio no qual não se utilizou carvão ativado ocorreu média de 0,3 brotos/explante.

Para o comprimento dos brotos (Figura 3B), obtiveram-se médias de 6,4 a 7,5 cm/broto formado em meristemas cultivados nas concentrações 0,5; 1,0 e 2,0 (g/L) de carvão ativado. Na ausência deste componente, a média foi de 1,0 cm/broto. Resultados similares foram obtidos por Simões, Paiva e Rodrigues

(1999) com a adição de 1,0 g/L de carvão ativado ao meio de cultura, proporcionando um melhor desenvolvimento no comprimento dos brotos formados de meristemas de orquídeas. Apesar de estatisticamente não ter sido detectada diferença entre os tratamentos testados, os resultados demonstram que a adição de carvão ativado promoveu melhor vigor dos brotos.

Na Figura 3C, observa-se ocorrência de calos com maior frequência nas menores concentrações de carvão ativado 0; 0,5 e 1,0 g/L. Os calos apresentavam coloração esverdeada e em alguns casos não houve ocorrência de brotações. Na concentração 2,0 g/L de carvão ativado não houve formação de calos, demonstrando que concentrações mais elevadas de carvão proporcionam inibição do processo de calogênese, mas não inibem a formação de brotos, como observado na Figura 3B.

Apesar de ter ocorrido formação de brotos e calos nas concentrações 0; 0,5 e 1,0 g/L, não se pode afirmar que os brotos tenham sido originados exclusivamente dos meristemas ou se foram formados a partir dos calos.

A formação de raízes (Figura 3D) ocorreu nos explantes cultivados em todas as concentrações testadas de carvão ativado, assim como na ausência desta substância, demonstrando que este processo não é influenciado pela presença de carvão no meio de cultura.

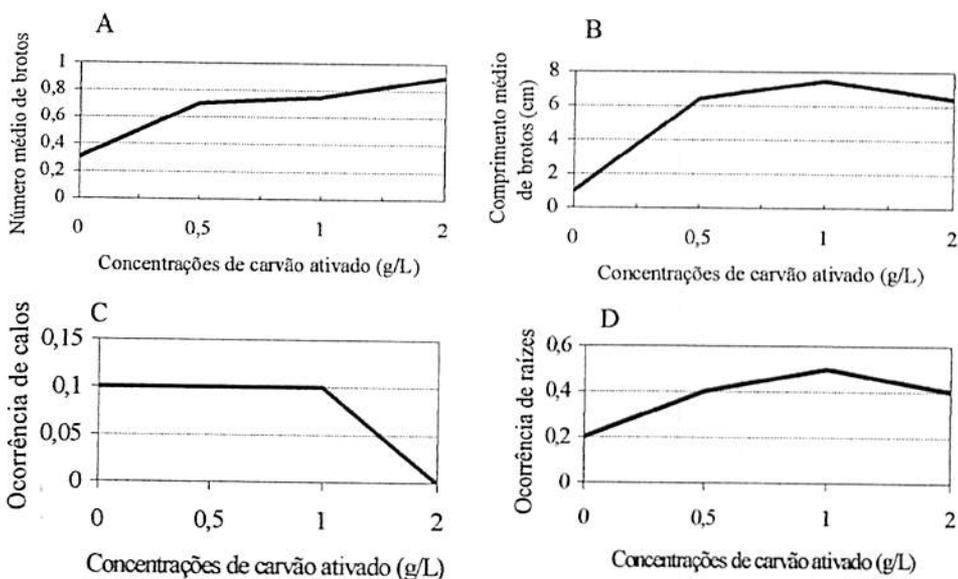


FIGURA 3. Número médio de brotos (A), comprimento médio de brotos (B), ocorrência de calos (C) e ocorrência de raízes (D), formados em meristemas de gladiolo cultivados em diferentes concentrações de carvão ativado. UFLA, Lavras/MG, 1999.

De acordo com os resultados, pode-se inferir que a utilização de carvão ativado pode induzir a um melhor desenvolvimento dos meristemas de gladiolo.

A ocorrência de brotações, em porcentagens, estão representadas na Figura 4.

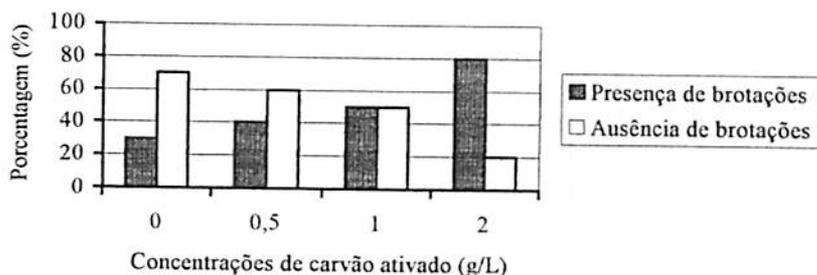


FIGURA 4. Porcentagem de formação de brotos em meristemas de gladiolo cultivados em diferentes concentrações de carvão ativado. UFLA, Lavras/MG, 1999.

#### 4.1.1.3 Efeito de diferentes concentrações de BAP em combinação com ANA

No desenvolvimento dos meristemas de gladiolo cultivados em meio de cultura acrescido de diferentes concentrações de BAP em combinação com ANA, houve diferenças entre os tratamentos testados para as características número e comprimento de brotos e ocorrência de calos.

O número de brotos formados foi influenciado pelo uso de ANA isoladamente. Maior número de brotos (Figura 5) foi obtido na ausência de ANA, sendo formado em média, 1,11 brotos. Na presença de ANA houve menor desenvolvimento dos meristemas e ocorreu formação de calos. Esses dados concordam em parte com os resultados de Pena et al. (1999), que registraram ocorrência maior número de brotos quando se adicionou 0,1 mg/L de ANA ao meio de cultura para o cultivo de meristemas de gladiolo. Não foi observado também efeito de citocininas sobre o desenvolvimento dos brotos.

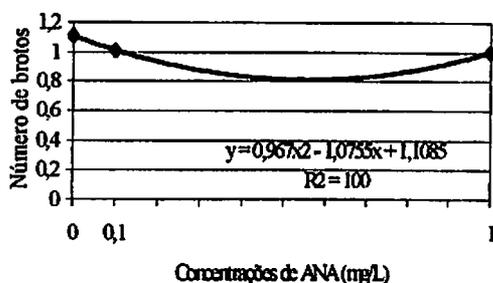


FIGURA 5. Efeito de diferentes concentrações de ANA na formação de brotos em meristemas de gladiolo. UFLA, Lavras/MG, 1999. \* Valores transformados por:  $\sqrt{x+1}$ .

Os reguladores de crescimento BAP e ANA, isoladamente, proporcionaram diferenças no comprimento dos brotos formados. A Figura 6A mostra que maior comprimento de brotos (1,16 cm) foi obtido quando se utilizou 0,77 mg/L de BAP ou na ausência de ANA (Figura 6B), formando

brotos com 1,22 cm, em média. Quando as concentrações de BAP e de ANA foram aumentadas, houve a inibição do desenvolvimento de brotações.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), concentrações menores de reguladores, da ordem de décimos de miligrama, são mais comuns para o cultivo de ápices caulinares pequenos ou meristemas.

A supressão do regulador de crescimento ANA do meio de cultura para indução de brotações concorda com as indicações de Hussey (1977), que afirma que a adição de ANA ao meio de cultura inibe o crescimento dos brotos de gladiolo.

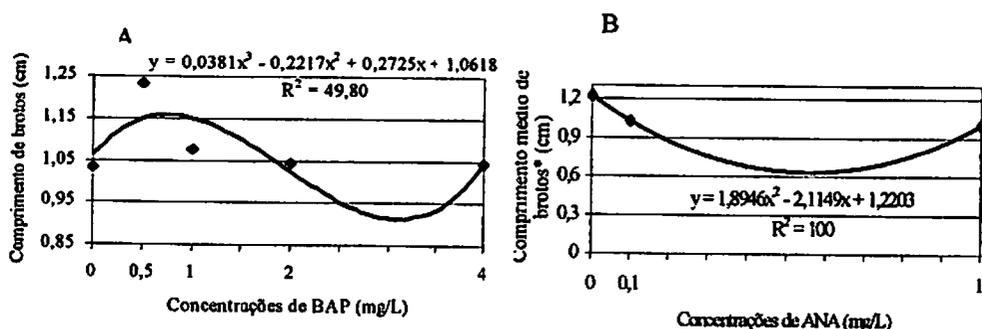


FIGURA 6. Efeito de diferentes concentrações de BAP (A) e ANA (B) adicionados ao meio de cultura sobre o comprimento médio de brotos em meristemas de gladiolo. UFLA, Lavras/MG, 1999.

\*Valores transformados por:  $\sqrt{x+1}$

A ocorrência de calos foi influenciada apenas pela adição do regulador de crescimento ANA, isoladamente. Estes resultados estão representados na Figura 7. Observa-se que menor calogênese foi observada na concentração 0,62 mg/L de ANA. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), alguns décimos de miligrama de reguladores de crescimento, no caso o ANA, são suficientes para estimular a formação de calos. Os calos produzidos neste experimento tinham coloração esverdeada e tamanho reduzido.

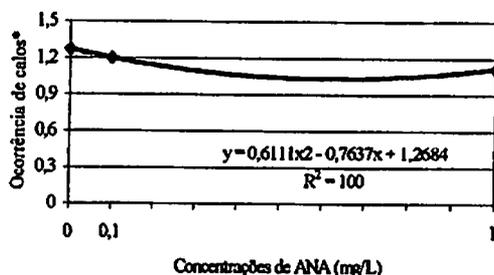


FIGURA 7. Efeito de diferentes concentrações de ANA na ocorrência de calos em meristemas de gladiolo. UFLA, Lavras/MG, 1999. \*Valores transformados por:  $\sqrt{x+1}$

#### 4.1.2 Gemas

Encontram-se na Tabela 2 os resultados obtidos nos experimentos de estabelecimento *in vitro* das gemas, avaliando-se o efeito de diferentes concentrações do meio MS, da adição de carvão ativado ao meio de cultura e o efeito dos reguladores de crescimento BAP em combinação com ANA.

TABELA 2. Valores de significância calculados conforme o critério de Kruskal-Wallis, para testar a hipótese de igualdade entre tratamentos dos diferentes experimentos em função das características observadas: número e comprimento de brotos e ocorrência de calos e raízes. UFLA, Lavras/MG, 1999.

Experimentos	Número de brotos	Comprimento de brotos	Ocorrência de calos	Ocorrência de raízes
Concentrações de MS	0,0134**	0,0244**	-	0,0057*
Concentrações de carvão ativado	0,6931	0,5856	-	0,5407
BAP x ANA	0,1012	0,1010	0,0014*	-

\* Significativo a 1% de probabilidade.

\*\* Significativo a 5% de probabilidade.

Na Tabela 2 observa-se que o desenvolvimento das gemas, que ao contrário dos meristemas, foi influenciado pelas concentrações do meio MS testadas para as características observadas: número e comprimento de brotos e ocorrência de calos e raízes. No experimento em que se testou o efeito de diferentes concentrações de carvão ativado adicionado ao meio de cultura, não se observou influência no desenvolvimento das gemas. As diferentes concentrações de BAP em combinação com ANA, adicionadas ao meio de cultura, também não promoveram diferenças significativas para as características número e comprimento de brotos. Para a ocorrência de calos, foi observada influência dos tratamentos testados. Neste experimento não foi observada ocorrência de raízes.

#### **4.1.2.1 Efeito de diferentes concentrações do meio MS**

O número e comprimento de brotos e ocorrência de raízes desenvolvidos de gemas de gladiolo foram influenciados pelas diferentes concentrações do meio MS, conforme análise estatística. Na Figura 8 observa-se que o melhor desenvolvimento das gemas foi obtido quando se utilizou o meio MS na concentração 125%, havendo formação de 1,17 brotos com 1,98 cm em média, além de maior ocorrência de raízes.

Explantos cultivados em meio com 25% do meio MS apresentaram desempenho inferior para todas as características avaliadas. As concentrações de 50%, 75% e 125% proporcionaram um desenvolvimento intermediário. A redução das concentrações do meio MS não permitiu um desenvolvimento de brotos satisfatório, sendo inferior ao obtido em 100%.

Em comparação ao desenvolvimento dos meristemas, houve maior número e comprimento de brotos e ocorrência de raízes quando se utilizaram gemas como explante para o estabelecimento inicial.

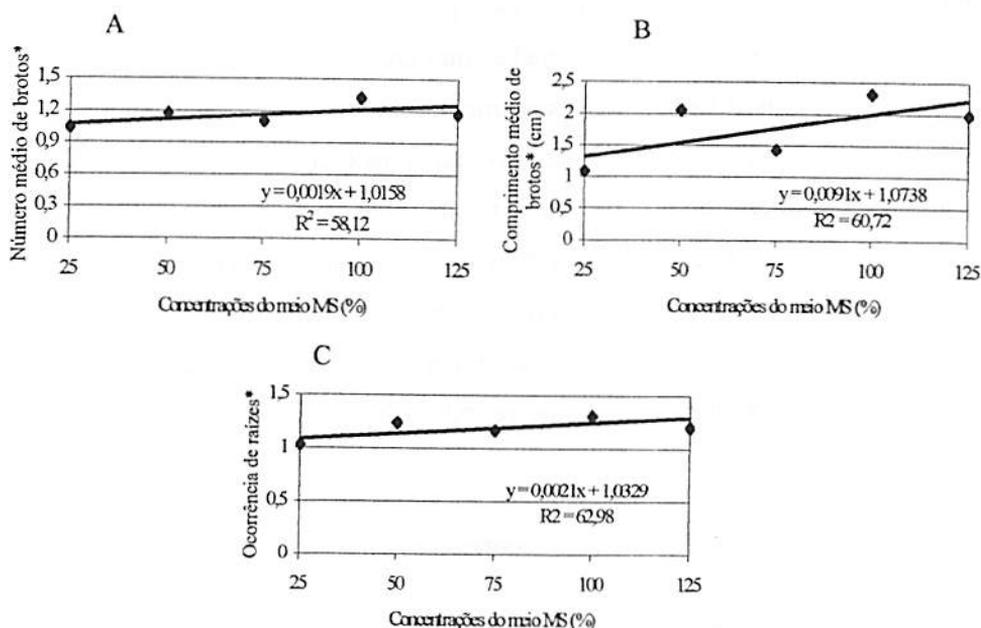


FIGURA 8. Efeito de concentrações do meio MS sobre o número de brotos (A), o comprimento de brotos (B) e a ocorrência de raízes (C), formados no cultivo de gemas axilares *in vitro*. UFLA, Lavras/MG, 1999.\*Valores transformados por:  $\sqrt{x+1}$ .

As porcentagens das brotações formadas em gemas cultivadas em diferentes concentrações do meio MS estão representadas na Figura 9.

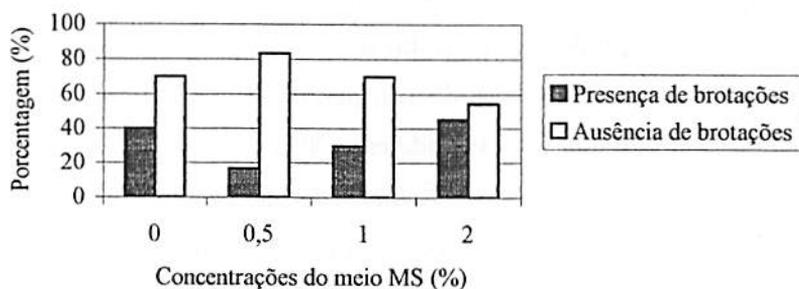


FIGURA 9. Porcentagem de brotações formadas em gemas de gladiolo cultivadas em diferentes concentrações do meio MS. UFLA, Lavras/MG, 1999.

#### 4.1.2.2 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado

As diferentes concentrações de carvão ativado não influenciaram o desenvolvimento das gemas. Os resultados estão demonstrados na Figura 10. A formação média de brotos por explante variou entre 0,17 a 0,45, para os diferentes tratamentos testados (A). Para o comprimento de brotos (B), a maior altura foi obtida na presença de 2,0 g/L de carvão ativado, com média de 4,0 cm/broto.

A ocorrência de raízes foi melhor nos meios com 0 e 2,0 g/L, não tendo sido observada nos meios com 0,5 e 1,0 g/L de carvão ativado (C). Comparado com o estabelecimento dos meristemas, o desenvolvimento das gemas cultivadas em carvão ativado, foi menor em relação ao número e comprimento de brotos. Indica-se então que não é necessário utilizar carvão ativado no cultivo de gemas de gladiolo, pois a sua presença não provocou alterações na indução de brotações.

Em outras culturas, o uso de carvão ativado é essencial, como relatam Campos, Santos e Pasqual (1999). Estes autores constataram que o melhor desenvolvimento da parte aérea, sistema radicular e altura das plantas em embriões de café foi obtido com a utilização de 2,0 g/L de carvão ativado combinado com 1,0 mg/L de GA<sub>3</sub>. Bressan et al. (1999) obtiveram o mesmo resultado para o desenvolvimento de “seedlings” de orquídeas.

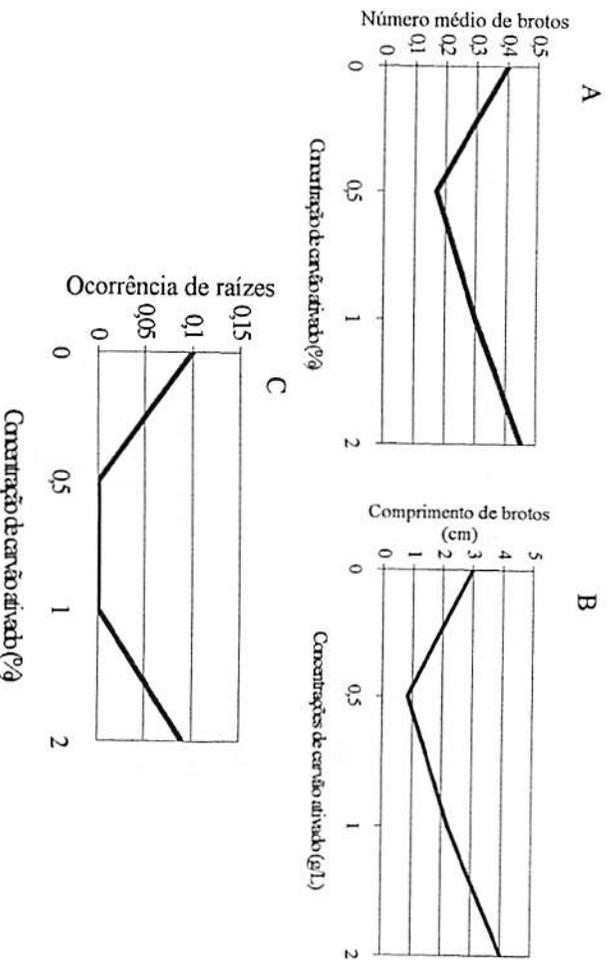


FIGURA 10. Número médio de brotos (A), comprimento médio de brotos (B) e a ocorrência de raízes (C) formados em gemas de gladiolo cultivadas em diferentes concentrações de carvão ativado. UFPA, Lavras/MG, 1999.

As porcentagens de formação de brotações estão representadas na Figura 11.

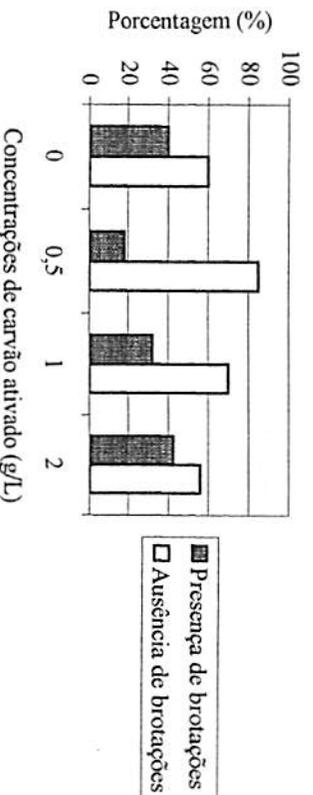


FIGURA 11. Porcentagem de formação de brotos em gemas de gladiolo cultivadas em diferentes concentrações do meio MS. UFPA, Lavras/MG, 1999.

#### **4.1.2.3 Efeito de diferentes concentrações de BAP em combinação com ANA**

As diferentes concentrações de BAP em combinação com ANA influenciaram apenas a formação de calos. Os resultados estão apresentados na Figura 12. Para a ocorrência de calos em meio de cultura com 0,1 mg/L de ANA, -Figura 12B-, não foi possível obter uma equação que se ajustasse às variações observadas em função dos tratamentos. Observa-se, na Figura 12A, que, na ausência do regulador de crescimento ANA, houve menor ocorrência de calos, o que é desejável nesta fase. Este efeito foi acentuado em baixas concentrações de BAP (0 e 0,5 mg/L) e na concentração mais elevada (4 mg/L). Na Figura 12C observa-se que menor ocorrência de calos foi observada utilizando-se ANA na concentração de 1 mg/L e na ausência de BAP. Comparando-se os resultados, obtidos para explantes cultivados na ausência e presença de ANA, observa-se que, em geral, houve maior ocorrência de calos quando se utilizam o regulador de crescimento ANA. Com estes resultados pode-se inferir que, no cultivo de gemas, ocorrem menor ocorrência de calos quando se utiliza concentrações mais baixas de BAP e ANA ou na ausência destes.

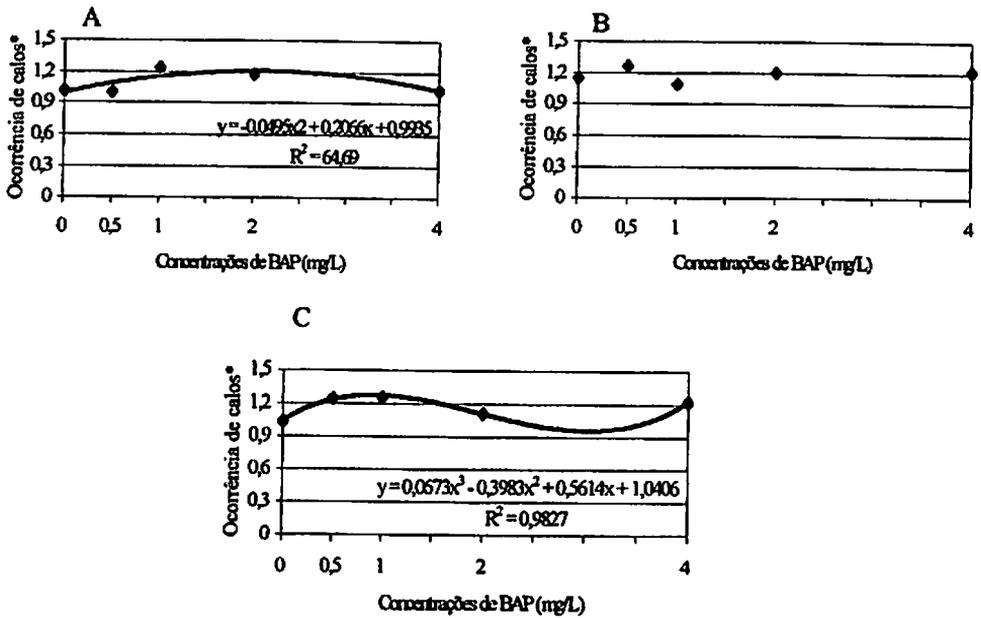


FIGURA 12. Efeito de concentrações de BAP sobre a ocorrência de calos em gemas de gladiolo cultivadas na ausência de ANA (A), 0,1 mg/L de ANA (B) e 1 mg/L (ANA). UFLA, Lavras/MG, 1999.  
\*Valores transformados por:  $\sqrt{x+1}$ .

#### 4.1.2.4 Efeito de diferentes concentrações de BAP, em combinação com ANA, sobre a regeneração de calos

Encontram-se na Tabela 3 os resultados obtidos para a regeneração de calos, cultivados em diferentes concentrações dos reguladores de crescimento BAP em combinação com ANA.

TABELA 3. Valores de significância calculados conforme o critério de Kruskal-Wallis, para testar a hipótese de igualdade entre tratamentos em função das características observadas número e comprimento de brotos. UFLA, Lavras/MG, 1999.

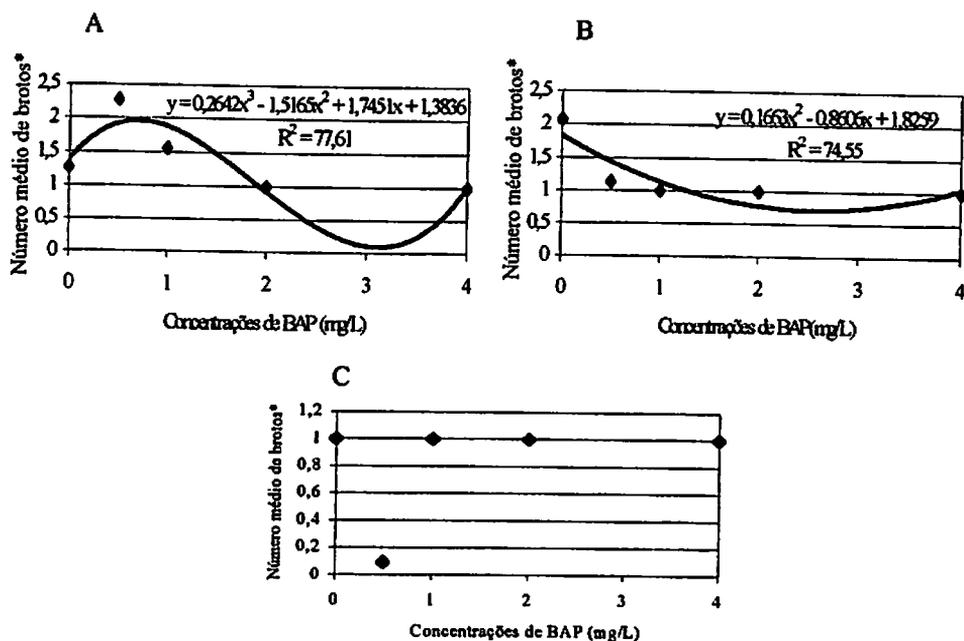
Experimento	Número de brotos	Comprimento de brotos
BAP x ANA	0,001*	0,001*

\* Significativo a 1% de probabilidade.

Na Tabela 3 pode-se observar que o uso de diferentes concentrações de BAP em combinação com ANA influenciou a regeneração dos calos formados, ocorrendo diferenças no número e comprimento dos brotos.

Estão representados na Figura 13 os resultados correspondentes ao número de brotos formados, em função da utilização de BAP e ANA no meio de cultura. Quando se utilizou 1 mg/L de ANA (C), não foi possível obter uma equação que se ajustasse às variações observadas em função dos tratamentos. Na ausência de ANA (A), maior número de brotos foi obtido na concentração de 0,71 mg/L de BAP, com média de 1,95 broto. Na concentração 0,1 mg/L de ANA (B), maior número de brotos foi obtido em ausência de BAP, sendo formados, em média, 2,07 brotos/explante. Assim, pode-se afirmar que, para a regeneração de calos de gladiolo, baixas concentrações de reguladores de crescimento são eficientes, pois, em altas concentrações ocorreu apenas o aumento do tamanho de calos.

Resultados similares foram registrados por Jain, Kantia e Kothari (2001) que obtiveram regeneração de calos em cravos utilizando meio de cultura contendo baixas concentrações de 2,4-D e BAP ou, na ausência destes.



**FIGURA 13.** Efeito de concentrações de BAP sobre o número médio de brotos regenerados de calos de gladiolo cultivados na ausência de ANA (A), 0,1 mg/L de ANA (B) e 1 mg/L de ANA (C). UFLA, Lavras/MG, 1999. \*Valores transformados por:  $\sqrt{x+1}$ .

Na Figura 14 está demonstrado o efeito da interação de BAP e ANA sobre o comprimento de brotos formados. No meio de cultura, onde foi utilizada a concentração 1,0 mg/L de ANA (C), também não foi possível ajustar uma equação para as variações observadas nos tratamentos. Para a variável comprimento dos brotos a concentração de BAP que proporcionou maior altura foi 0,62 mg/L, na ausência de ANA, com média de 2,21 cm. Quando foi utilizado 0,1 mg/L de ANA, maior comprimento de brotos foi obtido na ausência de BAP no meio de cultura, apresentando 2,27 cm, em média.

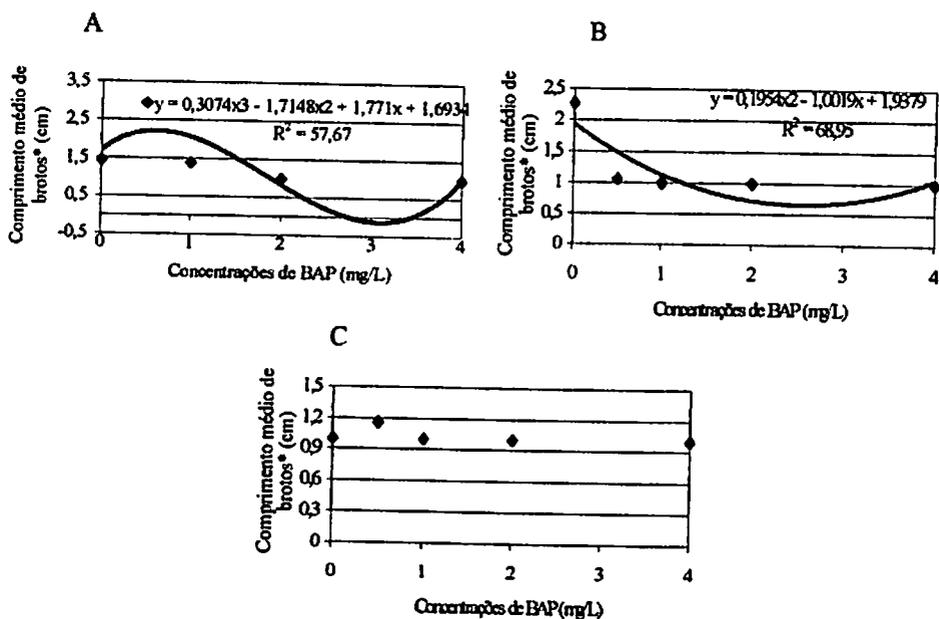


FIGURA 14. Efeito de concentrações de BAP sobre o comprimento médio de brotos regenerados de calos de gladiolo cultivados na ausência de ANA (A), 0,1 mg/L de ANA (B) e 1,0 mg/L de ANA (C). UFLA, Lavras/MG, 1999. \*Valores transformados por:  $\sqrt{x+1}$ .

#### 4.2 Estabelecimento *in vitro* de gladiolo através de segmentos foliares, pedúnculos florais e anteras imaturas

Não foi observada morfogênese ou calogênese foram cultivados *in vitro* explantes foliares, pedúnculos florais e anteras de gladiolo, independente do tratamento aplicado. Não houve oxidação, assim como também nenhuma contaminação foi observada. Os explantes permaneceram no meio de cultura sem alteração. Não foi possível, assim, reproduzir o protocolo desenvolvido por Bajaj, Sidh e Gill (1982), os quais utilizaram como fonte de explante para a propagação *in vitro* de gladiolo, segmentos foliares, haste de caule de inflorescências.

### 4.3 Multiplicação dos explantes

Na Tabela 4 encontram-se os resultados obtidos para os testes de multiplicação *in vitro* dos brotos de gladiolo. Avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de BAP em combinação com ANA, TDZ em combinação com ANA, carvão ativado e 2,4-D.

TABELA 4. Valores de significância calculados conforme o critério de Kruskal-Wallis para testar a hipótese de igualdade entre tratamentos dos diferentes experimentos em função das características observadas: número e comprimento de brotos, diâmetro de bulbo e ocorrência de calos e raízes. UFLA, Lavras/MG, 2000.

Experimentos	Número de brotos	Comprimento de brotos	Diâmetro de bulbo	Calos	Raízes
Concentrações de BAP x ANA	0,0380**	0,0004*	0,0094*	0,0004*	—
Concentrações de TDZ x ANA	0,3068	0,0365**	0,0025*	0,0011*	—
Concentrações de carvão ativado	0,3160	0,0270**	0,3247	—	0,2835
Concentrações de 2,4D	0,3365	0,7160	—	0,0051*	0,1868

\* Significativo a 1% de probabilidade

\*\* Significativo a 5% de probabilidade

Observa-se na Tabela 4 que no experimento em que se avaliaram as diferentes concentrações de BAP em combinação com ANA houve diferença entre os tratamentos testados para as características avaliadas. No experimento

no qual se testaram diferentes concentrações dos reguladores de crescimento TDZ em combinação com ANA, houve diferença significativa para as características comprimento de brotos, diâmetro de bulbo e ocorrência de calos. Neste experimento não houve formação de raízes. As diferentes concentrações de carvão ativado adicionado ao meio de cultura influenciaram apenas o comprimento dos brotos, não tendo sido observada influência sobre o número de brotos, diâmetro de bulbo formado ou ocorrência de raízes. As concentrações diferentes de 2,4-D testadas influenciaram apenas o desenvolvimento de calos, não tendo sido observada bulbificação.

#### **4.3.1 Efeito de diferentes concentrações de BAP, em combinação com ANA, sobre a multiplicação de gladiolo**

As características avaliadas, número e comprimento de brotos, diâmetro de bulbo e ocorrência de calos e raízes foram influenciadas pelas diferentes concentrações de BAP em combinação com ANA.

A Figura 15 mostra os resultados da interação de BAP e ANA sobre o número de brotos formados. Na ausência de ANA (A), o maior número de brotos foi obtido quando se utilizaram 2,5 mg/L de BAP, formando, em média, 1,44 broto. Maior número de brotos também foi conseguido para os explantes cultivados em 3,03 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de ANA (B), com média de 1,83 broto/explante. Nos meios de cultura onde se adicionou 1 mg/L de ANA (C), maior número de brotos (1,66 broto) foi alcançado quando foram adicionados 3,16 mg/L de BAP.

Baseado nos resultados deste experimento, sugere-se utilizar, na fase de multiplicação, 0,1 mg/L de ANA e 3,03 mg/L de BAP.

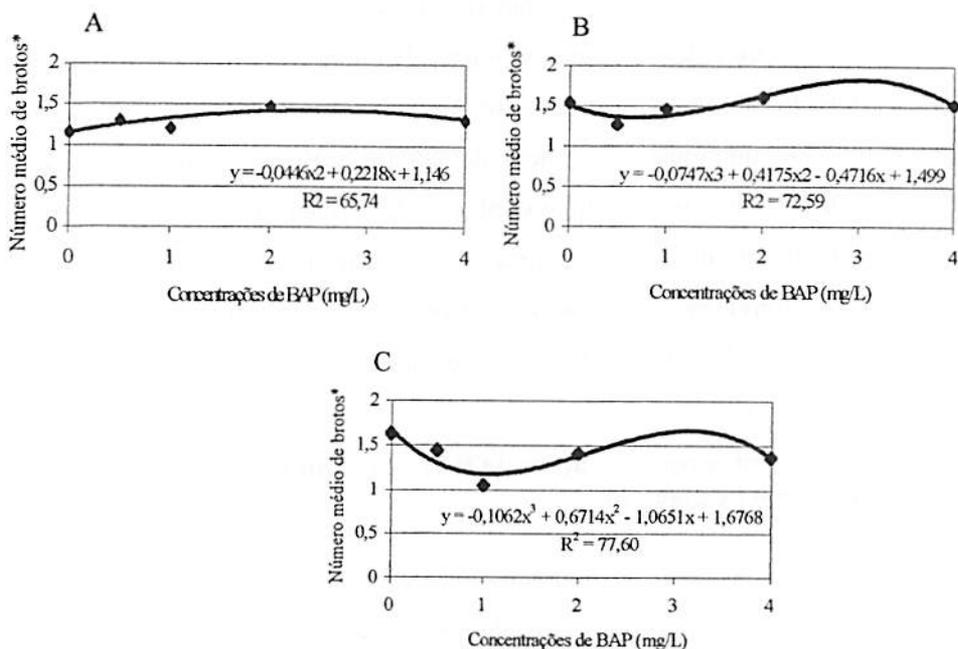


FIGURA 15. Efeito de concentrações de BAP sobre o número médio de brotos de gladiolo cultivados na ausência de ANA (A), 0,1 mg/L de ANA (B) e 1 mg/L de ANA (C). UFLA, Lavras/MG, 2000. \*Valores transformados por:  $\sqrt{x+1}$ .

Para o comprimento de brotos houve influência dos reguladores de crescimento BAP e ANA, isoladamente. Observa-se na Figura 16A que o maior comprimento de brotos foi obtido na ausência de BAP, formando brotos de 2,2 cm, em média. Quando se utilizou isoladamente ANA (16B), brotos de maior comprimento (2,8 cm) foram formados na concentração 0,58 mg/L.

Estes resultados concordam com os obtidos por Pena (1999), que verificou melhor desenvolvimento da parte aérea de gladiolo em meio sem a adição de reguladores de crescimento.

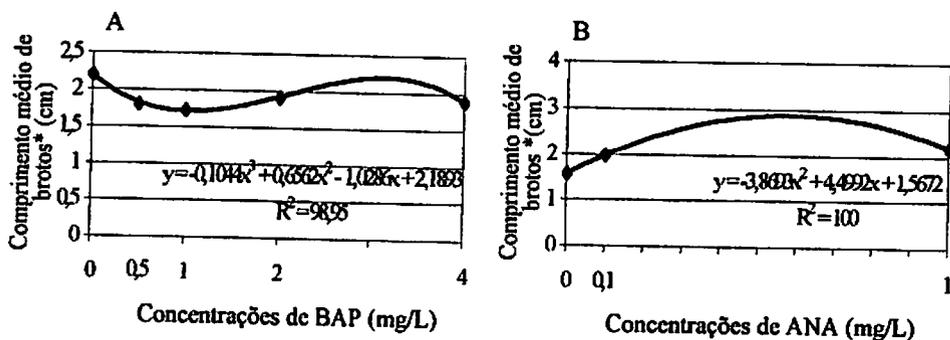


FIGURA 16. Efeito de concentrações de BAP (A) e de ANA (B) sobre o comprimento médio de brotos de gladiolo. UFLA, Lavras/MG, 2000. \*Valores transformados por:  $\sqrt{x+1}$ .

A ocorrência de calos também sofreu influência dos reguladores de crescimento BAP e ANA, isoladamente. Na Figura 17 pode-se observar que menor formação de calos ocorreu nos meios onde não se utilizou BAP ou ANA.

Esses dados são similares aos de Qi-Guang et al. (1986), que observaram que o excesso de BAP inibiu também a brotação de gemas, reduzindo drasticamente o número de partes aéreas formadas por explante e promovendo a formação de calos em culturas de *Castanea mollissima*.

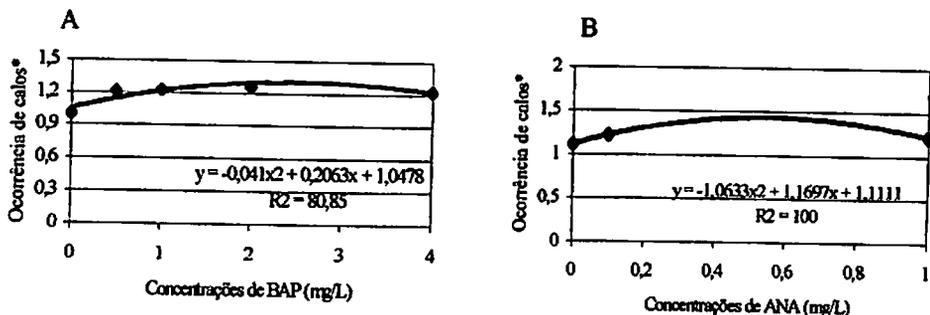


FIGURA 17. Efeito de concentrações de BAP (A) e de ANA (B) sobre a ocorrência de calos em brotos de gladiolo. UFLA, Lavras/MG, 2000. \*Valores transformados por:  $\sqrt{x+1}$ .

Para o diâmetro de bulbo formado houve diferença significativa apenas para as diferentes concentrações de BAP testadas, cujos resultados estão representados na Figura 18. Maior diâmetro foi obtido na concentração 3,14 mg/L de BAP com média de 2,1 mm/bulbo. Este resultado concorda com Pena (1999), que observou a formação de bulbo na base das plantas, quando o meio de cultura foi suplementado com 4,0 mg/L de BAP na ausência de ANA.

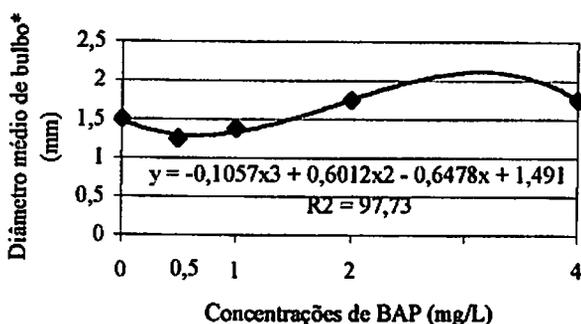


FIGURA 18. Efeito de concentrações de BAP sobre o diâmetro médio de bulbos formados em explantes de gladiolo. UFLA, Lavras/MG, 2001. \*Valores transformados por:  $\sqrt{x+1}$ .

### 4.3.2 Efeito de diferentes concentrações de TDZ em combinação com ANA

As diferentes concentrações dos reguladores de crescimento TDZ, em combinação com ANA, adicionadas ao meio de cultura, não influenciaram o número de brotos formados. Contudo houve diferença entre os tratamentos para as características comprimento de brotos, diâmetro de bulbo e ocorrência de calos. Não houve formação de raízes.

Os reguladores de crescimento TDZ e ANA, utilizados isoladamente, proporcionaram diferenças no comprimento de brotos formados, ocorrência de calos e diâmetro de bulbo, mas não houve efeito da interação.

Observa-se na Figura 19 que o maior comprimento de brotos (2,31 cm) foi obtido quando se utilizou 0,57 mg/L de TDZ. Quando se utilizou 0,55 mg/L de ANA houve a produção de brotos com 3,8 cm em média.

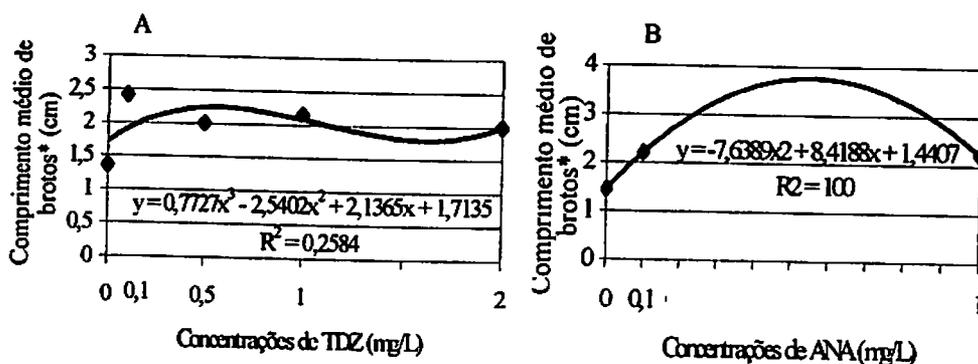


FIGURA 19. Efeito de diferentes concentrações de TDZ (A) e ANA (B) adicionadas ao meio de cultura sobre o comprimento médio de brotos de gladiolo. UFLA, Lavras/MG, 2000. \*Valores transformados por:  $\sqrt{x+1}$ .

Para a fase de multiplicação, a utilização das duas combinações de reguladores de crescimento, BAP x ANA ou TDZ x ANA promoveu desenvolvimento semelhante dos brotos em relação ao seu comprimento, com

valores entre 2,2 e 2,4 cm/broto. Assim é possível escolher o uso destas diferentes citocininas sem que haja alteração do desenvolvimento dos brotos.

Não se têm referências sobre o uso de TDZ para a multiplicação de gladiolo, mas, em outras culturas, o seu uso tem proporcionado resultados superiores em comparação com o uso de BAP, como observado por Nieuwkerk, Zimmerman e Fordham (1986). Estes mesmos autores verificaram que o TDZ estimulou a multiplicação de partes aéreas de macieira, em concentração bem inferior àquela do BAP. Nestes experimentos no entanto, não houve influência das diferentes concentrações de TDZ testadas sobre o número de brotos formados, mas o BAP na concentrações 3,03 mg/L associado a 0,1 mg/L de ANA produziu melhores resultados.

Na Figura 20, observa-se que a menor ocorrência de calos foi alcançada na ausência de TDZ ou ANA, isoladamente. Assim, o uso de reguladores de crescimento TDZ ou ANA, estimula a formação de calos. O mesmo ocorreu na presença de BAP.

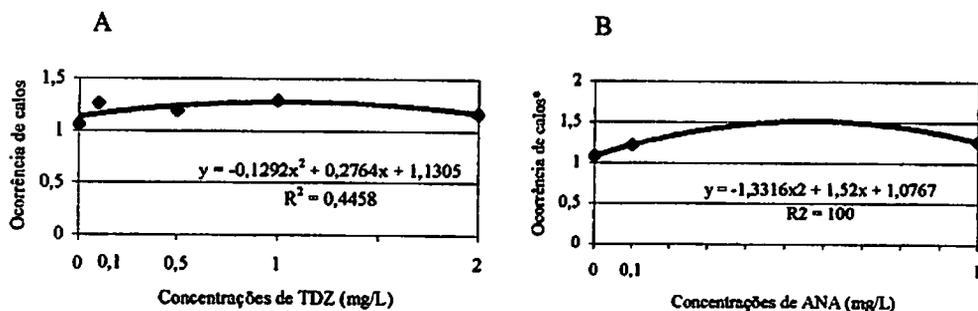


FIGURA 20. Efeito de concentrações de TDZ (A) e ANA (B) sobre a ocorrência de calos em brotos de gladiolo. UFLA, Lavras/MG, 2000. \*Valores transformados por:  $\sqrt{x+1}$ .

Analisando-se o diâmetro de bulbo formado, observa-se, na Figura 21, que o melhor resultado foi obtido com a utilização de TDZ na concentração de 1,12 mg/L, tendo sido obtidos bulbos com diâmetro médio de 1,9 mm. Quando

se utilizou ANA, maior diâmetro de bulbo (2,6 mm) foi observado na concentração 0,55 mg/L.

Para a indução de bulbificação *in vitro* recomenda-se então a utilização dos reguladores de crescimento TDZ e ANA em concentrações medianas.

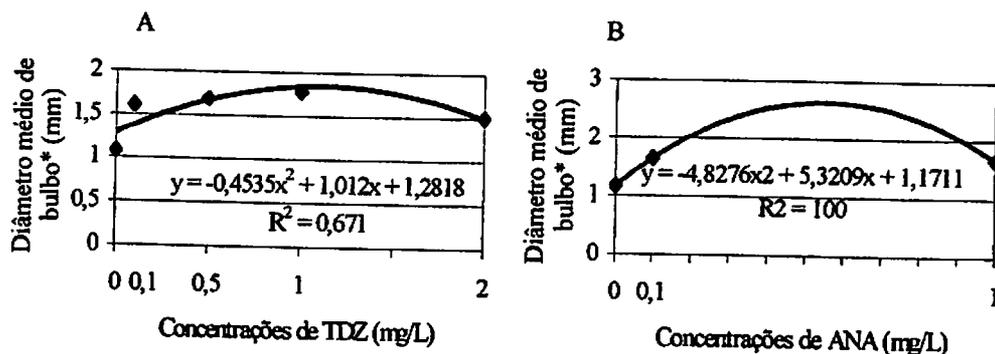


FIGURA 21. Efeito de concentrações de TDZ (A) e ANA (B) sobre o diâmetro médio de bulbos formados em explantes de gladiolo cultivados *in vitro*. UFLA, Lavras/MG, 2000. \*Valores transformados por:  $\sqrt{x+1}$ .

#### 4.3.3 Efeito de diferentes concentrações de carvão ativado

Apenas o comprimento dos brotos sofreu influência das diferentes concentrações de carvão ativado adicionadas ao meio de cultura. Pela Figura 22 observa-se que o maior comprimento de brotos foi obtido quando foram utilizados 3,03 g/L de carvão ativado, promovendo a formação de brotos com 3,8 cm, em média. O carvão ativado tem sido um coadjuvante útil para essa fase de alongamento por causa da sua capacidade de adsorver concentrações excessivas de fitoreguladores e compostos tóxicos, os quais inibem a morfogênese (Boulay, 1984; Fridborg et al., 1978).

Pode-se concluir, então, que, para a fase de multiplicação, a utilização

de carvão ativado pode ser benéfica para o alongamento da parte aérea, já que este promoveu maior comprimento médio de brotos em comparação com outras substâncias adicionadas ao meio de cultura.

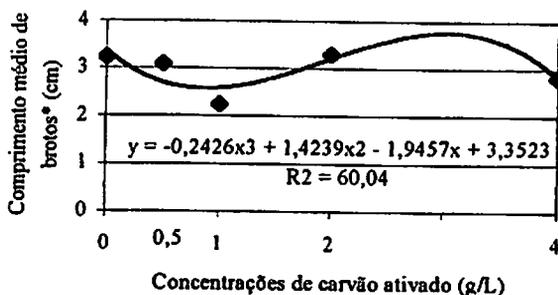


FIGURA 22. Efeito de concentrações de carvão ativado sobre o comprimento médio de brotos de gladiolo. UFLA, Lavras/MG, 2000. \*Valores transformados: por:  $\sqrt{x+1}$ .

Para as características número de brotos, diâmetro de bulbo e ocorrência de raízes, não houve influência das concentrações de carvão ativado testadas (Figura 23). Os explantes formaram, em média, 1,0 a 1,22 broto (A) com diâmetro variando de 2,15 a 5,42 mm/bulbo (B); a maior formação de raízes (C) ocorreu no tratamento no qual se adicionou 2,0 g/L de carvão ativado ao meio de cultura.

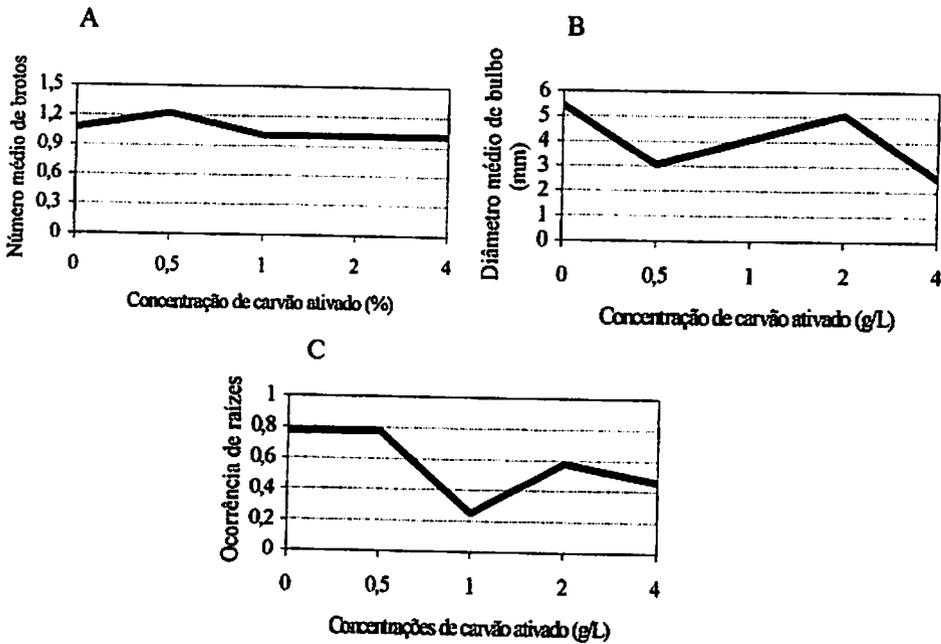


FIGURA 23. Número médio de brotos (A), diâmetro médio de bulbo (C) e ocorrência de raízes (C) formados na fase de multiplicação de explantes de gladiolo cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de carvão ativado. UFLA, Lavras/MG, 2000.

Estes resultados estão de acordo com Grattapaglia e Machado (1998), que afirmam que a utilização de carvão ativado em concentrações entre 0,1 a 2% (p/v) pode ser benéfico para a estimulação do desenvolvimento de raízes. Fisicamente, ele simula a condição de escuro no qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor.

#### 4.3.4 Efeito de diferentes concentrações de 2,4-D

A adição de diferentes concentrações de 2,4-D ao meio de cultura influenciou apenas a formação de calos, não tendo apresentado efeito sobre o

número e comprimento de brotos, bem como sobre a ocorrência de raízes.

Observa-se na Figura 24 que a menor ocorrência de calos foi obtida na ausência de 2,4-D, tendo ocorrido grande proliferação de calos de coloração esverdeada nos tratamentos em que foi aumentada a concentração de 2,4-D. Na concentração superior de 2,0 mg/L de 2,4-D, houve uma diminuição na formação de calos, o que pode ser atribuído à inibição provocada pela concentração elevada.

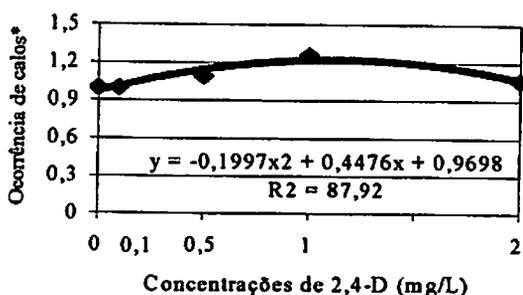


FIGURA 24. Efeito de concentrações de 2,4-D sobre a ocorrência de calos em brotos de gladiolo cultivados *in vitro*. UFLA, Lavras/MG, 2000.

\*Valores transformados: por:  $\sqrt{x+1}$ .

Estes resultados concordam com Grattapaglia e Machado (1998), que constataram que compostos com atividade auxínica, como o 2,4-D, praticamente não são utilizados para a micropropagação, a não ser quando o sistema demanda a indução de calo

Assim, quando se objetiva a proliferação de brotos, não se recomenda a utilização de 2,4-D. Esta substância deve ser adicionada ao meio de cultura apenas para indução de calogênese sendo recomendada a concentração de 1,0 mg/L de 2,4-D.

Na Figura 25 encontram-se os valores do número médio de brotos formados que variou de 1,6 a 4,3 (A) com, média de 6,1 a 10,1 cm/brotos (B). Observa-se também que houve, formação de raízes em todos os tratamentos.

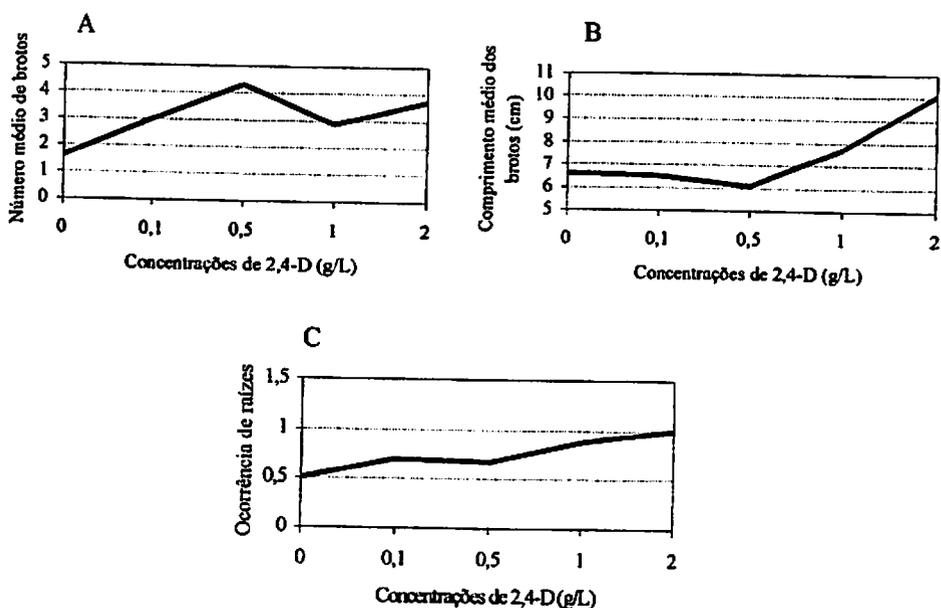


FIGURA 25. Número médio de brotos (A), comprimento médio dos brotos (B) e ocorrência de raízes (C), formados na fase de multiplicação de gladiolo cultivados em diferentes concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras/MG, 2000.

#### 4.4 Enraizamento e pré-aclimatização

##### 4.4.1 Efeito de diferentes concentrações de ANA para indução de enraizamento

A indução de enraizamento nos brotos de gladiolo formados *in vitro* foi influenciada pelas diferentes concentrações de ANA testadas, conforme análise estatística.

Pela Figura 26 pode-se observar que o maior enraizamento ocorreu nas plântulas cultivadas em 0,1 mg/L de ANA. Na ausência deste regulador de crescimento houve enraizamento, porém em volume. Em concentrações

superiores, a formação de raízes também foi reduzida.

Resultados semelhantes foram verificados por Pena (1999) que observou maior índice de crescimento de raízes em meio de cultivo suplementado com 0,1 mg/L de ANA. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a utilização de concentrações excessivas de auxina pode inibir a multiplicação ou favorecer a formação de calos.

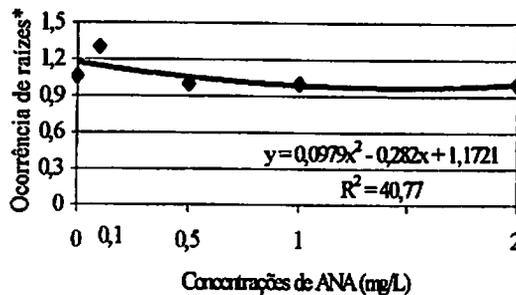


FIGURA 26. Efeito de diferentes concentrações de ANA sobre o enraizamento *in vitro* de brotos de gladiolo. UFLA, Lavras/MG, 2000. \*Valores transformados por:  $\sqrt{x+1}$ .

#### 4.4.2 Utilização de vermiculita *in vitro*

Em avaliações visuais pode-se observar que a utilização da vermiculita *in vitro*, adicionada em meio de cultura MS suplementado com 1 g/L de carvão ativado para pré-aclimatização dos explantes, proporcionou um bom enraizamento dos brotos na maioria das plântulas. Este enraizamento se deve, em parte, à utilização do meio líquido, que tende a estimular a formação de um sistema radicular com maior volume. A necessidade de uma forma de aeração e suporte deste meio pode ser superada pela adição de vermiculita que, além de promover a melhoria do enraizamento, pode ser uma alternativa de custo mais reduzido em relação ao ágar (Grattapaglia e Machado, 1998). Estima-se que esta economia seja de 42%.

O carvão ativado tem uma ação benéfica no alongamento de raízes, as quais crescem rapidamente, ramificando-se bastante (Drew, 1988; Gupta et al., 1983; Snir e Erez, 1980). De acordo com Vinterhaltera e Vinterhaltera (1994), raízes de bromélia aumentaram de comprimento em meio com 1% de carvão ativado.

No presente experimento, obteve-se média de 91% de enraizamento nas plantas cultivadas em meio de cultura para pré-aclimatização, utilizando vermiculita. Podendo-se indicar o seu uso em substituição ao ágar, nesta fase.

## **4.5 Acclimatização**

### **4.5.1 Efeito de diferentes substratos na acclimatização das plântulas de gladiolo**

Pela análise estatística não foram detectadas diferenças entre os substratos utilizados na acclimatização das plântulas de gladiolo, para nenhuma das características analisadas: comprimento, diâmetro de bulbo e raízes, ou seja, para a fase de acclimatização, pode-se utilizar qualquer um dos substratos ou escolhê-lo por meio de análise de custo, adquirindo aquele substrato de custo mais baixo. Houve sobrevivência de 100% das plântulas em todos os substratos utilizados. Na Figura 27, observam-se as medidas de comprimento médio das plântulas de gladiolo cultivadas nos vários substratos testados. As plântulas mediram, em média, de 19,83 a 27,05 cm/plântula, após 30 dias de cultivo.

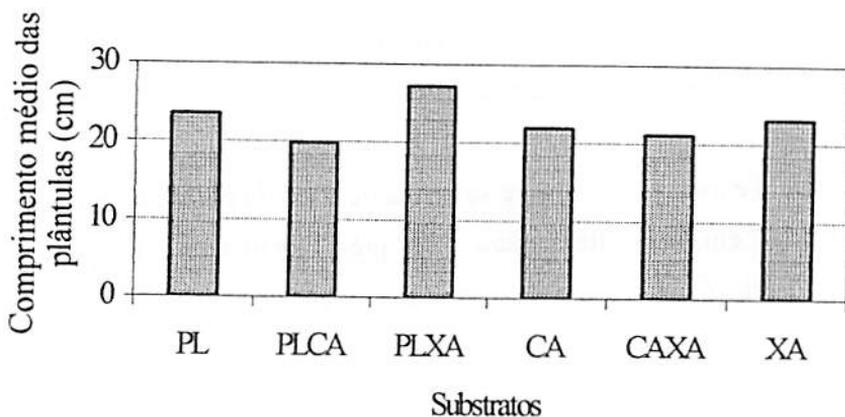


FIGURA 27. Comprimento médio das plantas de gladiolo aclimatizadas em diferentes substratos aos 30 dias de cultivo. PL: Plantmax, CA: casca de arroz, XA: xaxim. UFLA, Lavras/MG, 2001.

Pela Figura 28, observa-se o diâmetro médio dos bulbos formados em plântulas de gladiolo cultivados em diferentes substratos. As médias dos bulbos foram 4,17 a 4,83 mm/bulbo, não havendo diferença entre os tratamentos.

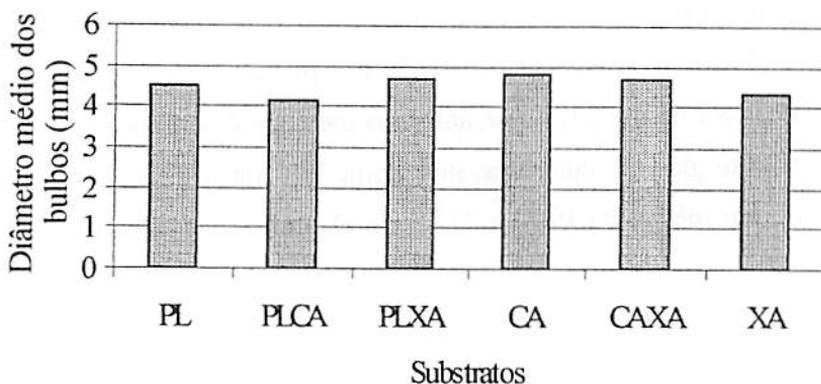


FIGURA 28. Diâmetro médio de bulbos de gladiolo em plantas aclimatizadas em diferentes substratos, aos 30 dias de cultivo. PL: Plantmax, CA: casca de arroz, XA: xaxim. UFLA, Lavras/MG, 2001.

Na Figura 29, observa-se que, também na característica tamanho das raízes não houve diferença entre os substratos utilizados. O tamanho médio das raízes foi 6,25 a 8,83 cm/plântula.

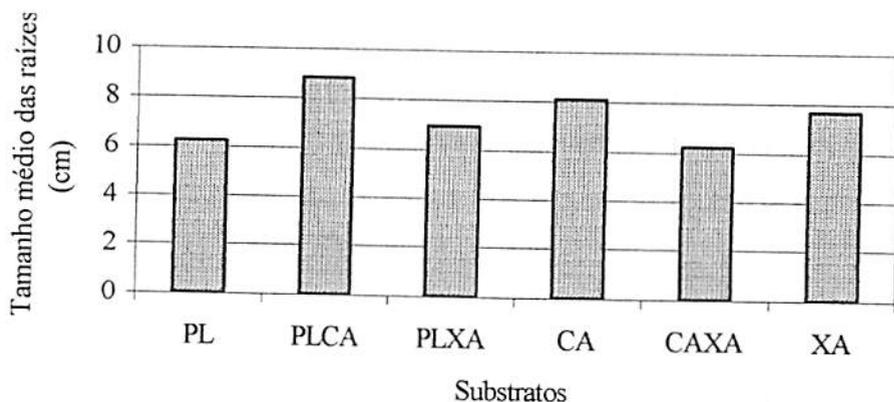


FIGURA 29. Tamanho médio das raízes formadas em plantas de gladiolo aclimatadas em diferentes substratos, aos 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras/MG, 2001.

Por meio destes resultados, pode-se inferir que os substratos testados não influem na fase de aclimatização de plantas de gladiolo estabelecidas *in vitro*. Isto pode ser atribuído ao fato de os substratos testados terem apresentado boa porosidade.

## 5 CONCLUSÕES

Como protocolo de propagação *in vitro* de gladiolo ficou estabelecido que:

- para a fase de estabelecimento, devem ser utilizados, como explantes, gemas, as quais devem ser cultivadas em meio MS 125%;
- na fase de multiplicação, as plântulas de gladiolo devem ser cultivadas em meio MS acrescido de 3,03 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de ANA;
- para o enraizamento, os brotos devem ser transferidos para meio MS acrescido de 0,1 mg/L de ANA;
- a pré-aclimatização deve ser realizada transferindo-se as plântulas para meio MS 50% acrescido de 1 g/L de carvão ativado e vermiculita *in vitro*, em substituição ao ágar;
- para a aclimatização, o uso dos substratos Plantimax, casca de arroz carbonizada e pó de xaxim, isolados ou associados, promoveu bom desenvolvimento das plântulas de gladiolo, sem mostrar diferenças entre si.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO EL-NIL, M.M. Organogenesis and embriogenesis in callus culture of garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Science Letters**, Shannon, v.9, n.1, p.59-264, Mar. 1977.
- ANDERTON, E.W.; PARK, R. **Growing gladioli**. London: Timber-Press, 1989. 166p.
- BAJAJ, Y.P.S.; SIDHU, M.M.S.; GILL, A.P.S. Micropropagation of *gladiolus*. In: BAJAJ, Y.P.S.; SIDHU, M.M.S.; GILL, A.P.S. **High-tech and micropropagation IV**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. v.20, cap.10, p.135-143.
- BAJAJ, Y.P.S.; SIDHU, M.M.S.; GILL, A.P.S. Some factors affecting the *in vitro* propagation of *gladiolus*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.18, p.269-275, 1982.
- BARBOSA, M.H.P.; PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P.; PINTO, C.A.B.P. Propagação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus ex hook cv. Appelbloesem: influência da adenina, tirosina e concentrações de sais do meio "MS". **Ciência e Prática**, Lavras, v.17, n.2, p.151-154, abr./jun. 1993.
- BATISTA, L.A. **Métodos de multiplicação de mudas matrizes de bananeira (Musa sp.), obtidas por cultura de meristemas**. Lavras: UFLA, 1996. 51p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- BOULAY, M. Aspects pratiques dela multiplication *in vitro* des essences forestiers. **Annales de Recherches Sylvicoles AFOCEL**, p.7-43, 1984.
- BRESSAN, E. de A.; LEE, L.L.; SEVERO, V.S.; GERALD, L.T.S. Desenvolvimento de orquídeas *Phalaenopsis in vitro*- efeito do carvão In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 12., 1999, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, 1999. p.111.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v.1, p.103, 1998.
- CAMPOS, H. de **Estatística experimental não-paramétrica**. 4.ed. Piracicaba, 1983. 349p.

- CHU, I.Y.E. The application of tissue culture to plant improvement and propagation in the ornamental horticulture industry. In: ZIMMERMAN, R.H.; GRIESBACH, R.J.; HAMMERSCHLAG, F.A; LAWSON, R.H. **Tissue culture as plant production system for horticultural crops.** Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p.15-135.
- COUTINHO, M.; CARVALHO, E.J.M. Caracterização das propriedades de alguns substratos para propagação de mudas. **Bragantia**, Campinas, v.14, n.1, p.167-176, 1983.
- CRISP, P.; WALKEY, D.G.A. The use of aseptic meristem culture in cauliflower breeding. **Euphytica**, Wageningen, v.23, n.2, p.205-213, June 1974.
- CROCKETT, J.U. **Bulbs.** Netherland: Time-Life Books, 1977. 160p.
- DREW, R.A. Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature fieldgrown trees. **HortScience**, Alexandria, v.23, n.3, p.609-611, June 1988.
- FERREIRA, D.F. SISVAR. Versão 4.3 (Build 41), 1999.
- FRIDBORG, G.; ERIKSSON, T. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.34, p.306-308, 1975.
- FRIDBORG, G.; PEDERSEN, M.; LANDSTROM, L.E.; ERIKSSON, T. The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.43, p.104-106, 1978.
- GALLO, L.A.; CROCOMO, O.J. A cultura de tecidos em fitopatologia. In: FILHO, A.B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.25, p.495-505.
- GEBHARDT, K. Development of a sterile cultivation system for rooting of shoot tip cultures (red raspberries) in duroplast foam. **Plant Science**, Shannon, v.39, n.2, p.141-148, June 1985.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**, part 1 - the technology. 2.ed. Edington: Exegetics Limited, 1996. 1574p.

- \* GRATTAPAGLIA, P.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.89-164.
- GRATTAPAGLIA, P.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH, 1998. p.183-260.
- GROLI, P.R. **Composto de lixo domiciliar como condicionador de substratos para plantas arbóreas**. Porto Alegre: UFRGS, 1991. 125p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- GUHA, S.; MAHESHWARI, SC. *In vitro* production of embryos from anthers in *Datura*. *Nature*, London, v.204, n.4957, p.497, Oct. 1964.
- GUPTA, P.K.; MEHTA, U.J.; MASCARENHAS, A.F. A tissue culture method for rapid clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus torelliana* and *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.2, p.296-299, 1983.
- HAVRANEK, P., NOVAK, F.J. The bud formation in the callus cultures of *Allium sativum* L. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, v.68, p.308-318, 1973.
- HOLGATE, D.P. Propagation of ornamentals by tissue culture. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. New York: Springer-Verlag, 1977. p.18-42.
- HU, C.Y.; WANG, P.J.; Meristem, shoot tip, and bud-cultures. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (ed.). **Handbook of plant cell culture**, New York: McMillan, 1983. v.1, p.177-227.
- HUSSEY, G. *In vitro* propagation of gladiolus by precocious axillary shoot formation. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.6, p.287-296, 1977.
- JAIN, A.; KANTIA, A.; KOTHARI, S.L. De novo differentiation of shoot buds from leaf-callus of *Dianthus caryophyllus* L. and control of hiperhydricity. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.87, n.4, p.319-326, 2001.
- JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 11.ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1993. 777p.

- JONES, B.; SLUIS, C.J. Marketing of micropropagated plants. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1991. p.141-154.
- JUNG, M.; KAMPF, A.N. **Aproveitamento hortícolas de turfas no Rio Grande do Sul**, Porto Alegre: UFRGS, 1986. 35p.
- KOHLLENBACH, H.W.; WERNICKE, W. Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. **Zeitschrift Fuer Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v.86, p.463-472, 1978.
- KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.H.; MROGINSKI, L.A. (eds.). **Cultivo de tejidos em la agricultura - Fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p.41-78.
- LILIEN-KIPNIS, H., KOCHBA, M. Mass propagation of new *Gladiolus* hybrids. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.12, p.631-638, 1987
- LOGAN, A.E.; ZETTLER, F.W. Rapid in vitro propagation of virus indexed gladioli. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.164, p. 169-180, 1985.
- MURASHIGE, T. Plant growth substances in commercial uses of tissue culture. In: SKOOG, F. **Plant Growth Substances**, p.426-434, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NIELSEN, J.O.; HANSEN, J.; BRANDT, K. Synergism of thiadiazuron and benzyladenine in axillary shoot formation depends on sequence of application in *siscanthus x ogigormis* "Giganteus". **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.41, n.2, p.165-170, Feb. 1995.
- NIEUWKERK, J.P.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v.21, n.3, p.516-518, June 1986.
- NOVAK, F.J.; HAVEL, L.; DOLEZEL, J. *Allium*. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. (eds). **Handbook of plant cell culture**, New York: McMillan, 1986. p. 919-956.

- PAIVA, P.D. de O. **Estabelecimento *In Vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Ait.) e controle de oxidação com identificação dos compostos liberados no meio de cultura.** Lavras: UFLA, 1998. 84p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).
- PAIVA, P.D. de O.; SIMÕES, F.C.; VIEIRA, F.A.; FUINI, M.G.; PAIVA, R. **Cultura do Gladiolo.** Lavras - MG, 1999. 27p. (Boletim Técnico – Série Extensão)
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações.** Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159p.
- PENA, R. da C.M. **Podridão de *Fusarium* em palma de Santa Rita (*Gladiolus x grandiflorus* L.): identificação; variabilidade; patogenicidade e obtenção de plântulas de gladiolos a partir de cultura de meristemas.** Lavras: UFLA, 1999. 95p. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia).
- PENA, R. da C.M.; PAIVA, P.D. de O.; ABREU, M.S. de; PAIVA, R. **Efeito dos reguladores de crescimento BAP e cinetina sobre a multiplicação *in vitro* de gemas apicais de gladiolo var. White Friendship.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 12., 1999, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, 1999. p.106.
- PETERS, J.A.; BOBROWSKI, V.L; ROSINHA, G.M.S. **Produção de haplóides e duplo haplóides.** In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPB, 1999. p.569-611.
- PIERIK, R.L.M. ***In Vitro* culture of higher plants.** Dordrecht: Martinus Nyhoff Publishers, 1987. 344p.
- QI-GUANG, Y.; READ, P.E.; FELLMAN, C.D.; HOSIER, M.A. **Effect of cytokinin, IBA, and rooting regime on chinese chestnut cultured *in vitro*.** **HortScience**, Alexandria, v.21, n.1, p.133-134, Feb. 1986.
- REES, A.P. **Ornamental bulbs, corms and tubers.** Wallingford: CAB International, 1992. 220p.
- REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture.** Berlin: Springer-Verlag, 1977. 803p.
- SALINGER, J.P. **Producción comercial de flores.** Zaragoza: Acribia, 1991.

371p. *Gladiolus*, cap. 12, p.119-140.

SAMARTIN, A. A comparative study of effects of nutrient media and cultural conditions on shoot multiplication of *in vitro* cultures of *Camellia japonica* explants. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.64, n.1, p.73-79, Jan. 1989.

SAS INSTITUTE . SAS produces guide for computers. v.3, 6, ed. Cary, NC., 1993. 373p.

SIMÕES, F.C.; PAIVA, P.D. de O.; RODRIGUES, T.M. Efeito de diferentes meios de cultura, água de coco e carvão ativado na propagação *in vitro* de meristemas de *Epidendrum* sp. e *Dendrobium* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 12., 1999, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, 1999. p.109.

SIMONSEN, J.; HILDEBRANDT, A.C. *In vitro* growth and differentiation of *Gladiolus* plants from tissue culture. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.49, p.1817-1819, 1971.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of Society for Experimental Biology**, London, v.11, p.118-131, 1957.

SMITH, R.H.; MURASHIGE, T. *In vitro* development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. **American Journal of Botany**, Baltimore, v.57, n.5, p.562-568, May 1970.

SNIR, I.; EREZ, A. *In vitro* propagation of Malling Merton apple rootstocks. **HortScience**, Alexandria, v.15, n.5, p.597-598, Oct. 1980.

SOUZA, E.L.S. Conservação de germoplasma *in vitro*. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1988, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FCAV/UNESP/CENARGEM/EMBRAPA, 1988. p.102-105.

TAKEYOSHI, N.I.; ANRAKU, R.N.; NINAMI, K.; LIMA, A.M.L.P. Efeito de diversos substratos no enraizamento de *Chrysanthemum morifolium* cv. Polaris. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 2., 1983, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: EMBRAPA-DDT, 1984. 280p.

TILQUIM, J.P. Plant regeneration from stem callus of cassava. **Canadian**

**Journal of Botany**, Ottawa, v.57, n.16, p.1761-1763, Aug. 1979.

TISSERAT, B. Factors involved in the production of plantlets from date palm callus cultures. **Euphytica**, Wageningen, v.31, n.1, p.201-214, Mar. 1982.

VENTURA, J.A. **Fusariose do abacaxizeiro: caracterização do patógeno, epidemiologia da doença, resistência e micropropagação do hospedeiro** *In Vitro*. Viçosa: UFV, 1994. 111p. (Tese - Doutorado em fitopatologia).

VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M. Integrated management system for pineapple *Fusarium* disease control. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.334, p.439-453, 1993.

VINTERHALTERA, B.; VINTERHALTERA, D. True-to-the type *in vitro* propagation of *Aechmea fasciata* B. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.57, n.3, p.253-263, 1994.

WILFRET, G.J. Gladiolus. In: LARSON, R.A. **Introduction to floriculture**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1992. cap.6, p.143-157.

WILFRET, G.J. Shoot tip culture of gladiolus: an evaluation of nutrient media for callus tissue development. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Orlando, v.84, p.389-393, 1971.

ZHOU, J.; MA, H.; GUO, F.; LUO, X. Effect of thiadiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.36, n.1, p. 73-79, 1994.

ZIMMERMAN, R.H.; BROOME, OC. *In vitro* propagation of apple cultivars. **HortScience**, Alexandria, v.14, n.3, p.478, June 1979.

ZIV, M. Transplanting *Gladiolus* plants propagated *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam v.11, p.257-260, 1979.

ZIV, M.; HALEVY, A.H.; SHILO, R. Organs and plantlets regeneration of *Gladiolus* through tissue culture. **Annals of Botany**, London, v.34, p.671-676, 1970.