

**MARIA ELVIRA DE REZENDE**

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE KIWI [*Actinidia deliciosa* (A. Chevalier) Liang e Ferguson var. *deliciosa*] cvs. 'HAYWARD' E 'MATUA': Influência de concentrações do meio MS e sacarose e de níveis de ágar e pH**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador:**

Prof.<sup>o</sup>: MOACIR PASQUAL

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL**

**1996**

Faint, illegible text or markings in the center of the page.

Faint, illegible text or markings in the lower-left quadrant.

Faint, illegible text or markings in the lower-left quadrant.

Faint, illegible text or markings in the lower-right quadrant, possibly including a signature or stamp.

21951

MFV-011443

MARIA ELVIRA DE REZENDE

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE KIWI [*Actinidia deliciosa* (A. Chevalier) Liang e Ferguson var. *deliciosa*] cvs. 'HAYWARD' E 'MATUA': Influência de concentrações do meio MS e sacarose e de níveis de ágar e pH**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador:**  
Prof.º: MOACIR PASQUAL

MINAS G. - BRASIL

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da  
Biblioteca Central da UFLA

Rezende, Maria Elvira de.

Multiplicação *in vitro* de kiwi [*Actinidia deliciosa* (A. Chevalier) Liang e Ferguson var. *deliciosa*) cvs. 'Hayward' e 'Matua': Influência de concentrações do meio MS e sacarose e de níveis de ágar e pH / Maria Elvira de Rezende. – Lavras: UFLA, 1996.

71 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras.

Bibliografia.

1. Kiwi - Multiplicação *in vitro*. 2. Micropropagação. 3. Meio de cultura. 4. Sacarose. 5. Ágar. 6. pH. 7. Cultura de Tecidos. 8 Cultivo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.7253

**MARIA ELVIRA DE REZENDE**

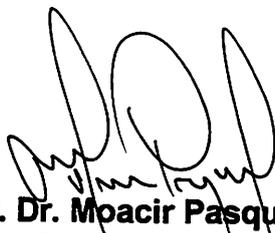
**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE KIWI [*Actinidia deliciosa* (A. Chevalier) Liang e Ferguson var. *deliciosa*] cvs. 'HAYWARD' E 'MATUA': Influência de concentrações do meio MS e sacarose e de níveis de ágar e pH**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

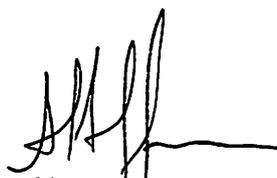
APROVADA em 11 de Outubro de 1996.



Prof.º MSc. Eduardo Bearzoti  
(Co-orientador)



Prof.º Dr. Moacir Pasqual  
(Orientador)



MSc. Alexandre Hoffmann

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1996**

A Deus,  
A meus pais.  
irmãos e sobrinhos,

**DEDICO.**

*"Que nossos esforços desafiem as impossibilidades..."*

(C. Chaplin)

A quem acredita e luta pela realização de seus ideais,  
**OFEREÇO.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras - UFLA

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior-  
CAPES.

Ao Professor Moacir Pasqual, pela amizade, estímulo e orientação durante o curso.

Ao Professor Eduardo Bearzoti, pelo carinho, paciência na transmissão dos ensinamentos e valiosas sugestões, além da brilhante co-orientação e grandiosa colaboração nas análises estatísticas.

Ao Professor José Eduardo Brasil P. Pinto, pela boa vontade no empréstimo de literaturas bastante úteis.

A meus pais, Jacy e Guaraciaba, pela vida e por acreditarem em mim.

A meus irmãos, Cláudia, Alba, Gláucio, Leila, Clécio e Jaciara, pela força e coragem.

Aos amigos especiais, Tânia Brito, Vantuil Rodrigues, Márcio Santana, Mário Tanaka, Cláudia Labory e Arildo Machado, pela afeição, solidariedade e compreensão nos diversos momentos.

A todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e dos cursos de pós-graduação, pelo incentivo e agradável convívio.

A todos que participaram de alguma forma e muito contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero obrigado.

## SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	viii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1 Aspectos fitotécnicos .....	3
2.2 Cultivo <i>in vitro</i> de kiwi .....	5
2.3 Caracterização do meio de cultura .....	7
2.3.1 Nutrientes .....	7
2.3.2 Carboidrato .....	8
2.3.3 Agente solidificante .....	10
2.3.4 pH .....	13
2.3.5 Fitorreguladores .....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1 Ensaios 1 e 2: Influência da concentração do meio de cultura (MS) e de sacarose na multiplicação <i>in vitro</i> das cultivares 'Hayward' e 'Matua' .....	17
3.2 Ensaios 3 e 4: Influência da concentração de ágar e do nível de pH na multiplicação <i>in vitro</i> das cultivares 'Hayward' e 'Matua' .....	17
3.3 Análises estatísticas .....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
4.1 Ensaios 1 e 2: Influência da concentração do meio de cultura (MS) e de sacarose na multiplicação <i>in vitro</i> das cultivares 'Hayward' e 'Matua' .....	20
4.1.1 Número de brotações .....	23

4.1.2 Comprimento de brotações .....	28
4.1.3 Peso da matéria seca da parte aérea de brotações .....	32
4.2 Ensaio 3 e 4: Influência da concentração de ágar e do nível de pH na multiplicação <i>in vitro</i> das cultivares 'Hayward' e 'Matua' .....	36
4.2.1 Número de brotações .....	40
4.2.2 Comprimento de brotações .....	46
4.2.3 Peso da matéria seca da parte aérea de brotações .....	46
5 CONCLUSÕES .....	59
5.1 Ensaio 1 e 2: Influência da concentração do meio de cultura (MS) e da sacarose na multiplicação <i>in vitro</i> das cultivares 'Hayward' e 'Matua' .....	59
5.1.1 Número de brotações .....	59
5.1.2 Comprimento de brotações .....	59
5.1.3 Peso da matéria seca da parte aérea de brotações .....	59
5.2 Ensaio 3 e 4: Influência da concentração de ágar e do nível de pH na multiplicação <i>in vitro</i> das cultivares 'Hayward' e 'Matua' .....	60
5.2.1 Número de brotações .....	60
5.2.2 Comprimento de brotações .....	60
5.2.3 Peso da matéria seca da parte aérea de brotações .....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61
ANEXOS .....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela		página
1	Resumo das análises de variância para número de brotações (NB), comprimento de brotações (CB) e peso da matéria seca da parte aérea (PMSPA) de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração do meio MS e de sacarose, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	22
2	Resumo das análises de variância para número de brotações (NB), comprimento de brotações (CB) e peso da matéria seca da parte aérea (PMSPA) de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração do meio MS e de sacarose, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	23
3	Resumo das análises de variância para número de brotações (NB), comprimento de brotações (CB) e peso da matéria seca da parte aérea (PMSPA) de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de ágar e do nível de pH, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	38
4	Resumo das análises de variância para número de brotações (NB), comprimento de brotações (CB) e peso da matéria seca da parte aérea (PMSPA) de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração de ágar e do nível de pH, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	39
5	Variações observadas nos valores de pH, 45 dias após o cultivo <i>in vitro</i> da cultivar 'Hayward', em função da concentração de ágar e do nível de pH ajustado inicialmente. UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	56

- 6 Variações observadas nos valores de pH, 45 dias após o cultivo *in vitro* da cultivar 'Matua', em função da concentração de ágar e do nível de pH ajustado inicialmente. UFLA, Lavras-MG, 1996 .....

## LISTA DE FIGURAS

Figura		página
1	Superfície de resposta para número de brotações da cultivar 'Hayward' ( $\sqrt{Y}$ ), em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	25
2	Diagrama de contornos para número de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	25
3	Análise de resíduos para número de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração do meio MS, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	26
4	Análise de resíduos para número de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de sacarose, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	26
5	Superfície de resposta para número de brotações da cultivar 'Matua' ( $\sqrt{Y+0,5}$ ), em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	27
6	Diagrama de contornos para número de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	27

7	Superfície de resposta para comprimento de brotações da cultivar 'Hayward' ( $\sqrt{(\text{cm})}$ ), em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	29
8	Diagrama de contornos para comprimento de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	29
9	Análise de resíduos para comprimento de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração do meio MS, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	30
10	Análise de resíduos para comprimento de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de sacarose, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	30
11	Superfície de resposta para comprimento de brotações da cultivar 'Matua' (cm), em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	31
12	Diagrama de contornos para comprimento de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	31
13	Superfície de resposta para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Hayward' ( $\sqrt{(\text{g})}$ ), em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	33
14	Diagrama de contornos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	33
15	Análise de resíduos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração do meio MS, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	34
16	Análise de resíduos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de sacarose, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 ....	34

17	Superfície de resposta para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Matua' ( $\sqrt{(g)}$ ), em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	35
18	Diagrama de contornos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	35
19	Superfície de resposta para número de brotações da cultivar 'Hayward' ( $\sqrt{(Y)}$ ), em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 ..	42
20	Diagrama de contornos para número de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	42
21	Análise de resíduos para número de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de ágar, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	43
22	Análise de resíduos para número de brotações da cultivar 'Hayward', em função do nível de pH, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	43
23	Superfície de resposta para número de brotações da cultivar 'Matua' ( $\sqrt{(Y+0,5)}$ ), em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo. <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	44
24	Diagrama de contornos para número de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	44
25	Análise de resíduos para número de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração de ágar ( $X_1$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	45
26	Análise de resíduos para número de brotações da cultivar 'Matua', em função do nível de pH, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	45

27	Superfície de resposta para comprimento de brotações da cultivar 'Hayward' ( $\sqrt{(\text{cm})}$ ), em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	47
28	Diagrama de contornos para comprimento de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	47
29	Análise de resíduos para comprimento de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de ágar, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	48
30	Análise de resíduos para comprimento de brotações da cultivar 'Hayward', em função do nível de pH, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	48
31	Superfície de resposta para comprimento de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	49
32	Diagrama de contornos para comprimento de brotações da cultivar 'Matua' (cm), em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	49
33	Superfície de resposta para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Hayward' ( $\sqrt{(\text{g})}$ ), em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	50
34	Diagrama de contornos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	50
35	Análise de resíduos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de ágar, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	52
36	Análise de resíduos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Hayward', em função do nível de pH, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	52

37	Superfície de resposta para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Matua' ( $\sqrt{g}$ ), em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	53
38	Diagrama de contornos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	53
39	Análise de resíduos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração de ágar, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	54
40	Análise de resíduos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Matua', em função do nível de pH, após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras-MG, 1996 .....	54

## RESUMO

REZENDE, Maria Elvira de. **Multiplicação *in vitro* de Kiwi [*Actinidia deliciosa* (A. Chevalier) Liang e Ferguson var. *deliciosa*] cvs. 'Hayward' e 'Matua': Influência de concentrações do meio MS e sacarose e de níveis de ágar e pH.** Lavras: UFLA, 1996. 71p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia)\*

Este trabalho objetivou estudar a influência de concentrações do meio MS e de sacarose, assim como avaliar o efeito dos níveis de ágar e pH na multiplicação *in vitro* das cultivares 'Hayward' e 'Matua'. Para tanto, utilizou-se duas estruturas diferentes de ensaio, as quais foram aplicadas as duas cultivares de kiwi estudadas, totalizando 4 ensaios. Primeiramente, foram testadas diversas combinações entre concentrações do meio MS (0, 50, 100, 150 e 200%) e de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g/l), em esquema fatorial 5 x 5, dispostos em um delineamento inteiramente ao acaso com 4 repetições. De acordo com modelos de superfície de resposta utilizados, pôde-se estimar as concentrações ótimas desses fatores. O número máximo de brotações da cultivar 'Hayward' poderia ser obtido combinando-se 117,31% de meio MS com 36,10 g/l de sacarose; enquanto que, para a cultivar 'Matua', o maior número seria observado em meio contendo 98,46% de MS, sendo este suplementado com 13,90 g/l de sacarose. Quanto ao comprimento de brotações, a cultivar 'Hayward' apresentaria seu melhor resultado em meio contendo 200% de MS e 36,30 g/l de sacarose; já a cultivar 'Matua', quando 163,51% de MS fossem combinados com 35,20 g/l de sacarose. Em relação ao PMSPA de brotações, este seria considerado ótimo para a cultivar 'Hayward', na combinação de 134,96% de MS com 48,70 g/l de sacarose; no entanto, para a cultivar

---

\* Orientador: Moacir Pasqual. Membros da banca: Alexandre Hoffmann e Eduardo Bearzoti

'Matua', se combinasse 134,63% de MS com 51,60 g/l de sacarose. Nos ensaios subsequentes, os meios com níveis de pH ajustados em 3,7; 4,7; 5,7; 6,7 e 7,7 foram combinados com 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0% de ágar, resultando num fatorial 5 x 6, dispostos em delineamento inteiramente ao acaso com 4 repetições. De maneira semelhante, foram ajustados modelos de superfície, com os quais foi possível também estimar as melhores combinações. A cultivar 'Hayward' poderia obter maior número de brotações na combinação do pH 5,85 com 0,82% de ágar; todavia, a cultivar 'Matua', se o pH 3,70 fosse combinado com 0,62% de ágar. As maiores brotações da cultivar 'Hayward' poderiam ser produzidas em meio solidificado com 0,45% de ágar e com pH ajustado para 4,70; já a cultivar 'Matua', na associação entre o pH 4,28 com 0,48% de ágar. Em relação ao PMSPA de brotações, a cultivar 'Hayward' poderia mostrar melhor resposta na combinação do pH 7,70 com o ágar a 0,39%; enquanto que, para a cultivar 'Matua', o máximo poderia ser obtido se o pH 3,70 fosse combinado com 0,53% de ágar.

## ABSTRACT

### **IN VITRO MULTIPLICATION OF KIWI [*Actinidia deliciosa* (A. Chevalier) Liang and Ferguson var.*deliciosa*] cvs. 'HAYWARD' AND 'MATUA': Influence of MS medium and sucrose concentrations and of agar and pH levels**

This work aimed to study the influence of MS medium and sucrose concentrations, as well as to evaluate the effect of agar and pH levels on *in vitro* multiplication of 'Hayward' and 'Matua' cultivars. Two trials were set up to each of the two cultivars of kiwi, amounting to four experiments. The former consisted of several combinations of concentrations of the MS medium (0, 50, 100, 150 and 200%) and sucrose (0, 15, 30, 45 and 60 g/l), in a 5 x 5 factorial scheme, using a completely randomized design with 4 replications. According to response surface models utilized, it has been possible to estimate the optimum concentrations of these factors. The maximum number of shoots of 'Hayward' cultivar could be obtained by combining 117,31% of MS medium with 36,10 g/l of sucrose; while to 'Matua' cultivar, the highest number of shoots would be found in a medium containing 98,46% of MS supplemented with 13,90 g/l of sucrose. As for shoot length, 'Hayward' cultivar would show best results in a medium containing 200% of MS and 36,30 g/l of sucrose; however, 'Matua' cultivar in a medium with 163,51% of MS, combined with 35,20 g/l of sucrose. Concerning dry weight of shoots, the optimum would be attained for 'Hayward' cultivar, in the combination of 134,96% de MS with 48,70 g/l of sucrose; however, to 'Matua' cultivar, if one combined 134,63% of MS with 51,60 g/l of sucrose. In the other two trials, media with pH levels 3,7; 4,7; 5,7; 6,7 and 7,7 were combined with 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 and

1,0% of agar, resulting in a 5 x 6 factorial, using a completely random design with 4 replications. Response surface models were then adjusted, enabling the estimation of the best combinations of the factors. 'Hayward' cultivar could obtain highest number of shoots in the combination of pH 5,85 with 0,82% of agar; however, 'Matua' cultivar would do so with a pH level of 3,70 combined with 0,62% of agar. The largest shoots of 'Hayward' cultivar could be produced in a medium solidified with 0,45% of agar and with a pH level of 4,70; but those of 'Matua' cultivar, in an association of pH 4,28 and 0,48% of agar. For the trait dry weight of shoots, 'Hayward' cultivar could show best response in the combination of pH 7,70 with agar at 0,39%; whereas to 'Matua' cultivar the maximum dry weight would be obtained if pH 3,70 were combined with 0,53% of agar.

## 1 INTRODUÇÃO

O kiwi [*Actinidia deliciosa* (A. Chevalier) Liang e Ferguson var. *deliciosa*], sob o ponto de vista frutícola, tem demonstrado popularidade e revelado alta rentabilidade. A planta é ainda dotada de excelente qualidade ornamental, dadas as suas características de trepadeira, com flores exuberantes e também por apresentar fruto bastante exótico.

Com a introdução na Nova Zelândia, e após a seleção e melhoramento da espécie, descobriu-se que o fruto possuía expressivo potencial para exploração comercial, além de grande aceitação nos mercados consumidores. A apreciação pelo fruto deve-se à excelente qualidade organoléptica e ao elevado valor nutricional, visto que contêm altos teores em vitamina C e baixa quantidade de calorias.

A cultura de kiwi no Brasil tem interessado fruticultores de diferentes pólos agrícolas, sendo considerada uma alternativa bastante promissora para a fruticultura nacional, especialmente em regiões de clima temperado.

O interesse crescente pelo cultivo de kiwi é devido aos bons preços alcançados pelo fruto no mercado nacional, ao baixo custo de produção e por apresentar poucos problemas fitossanitários, justificando o aumento do número de produtores, bem como o da área plantada.

Com a expansão da cultura pelos Estados do Sul e Sudeste, um dos principais problemas enfrentados pelos produtores é a obtenção de mudas de autenticidade varietal comprovada.

Os métodos de propagação mais recomendados consistem basicamente em estaquia e enxertia. A nível comercial, a estaquia de caule tem demonstrado ser o método mais adequado do ponto de vista técnico. Entretanto, em virtude do requerimento de grandes lotes de plantas uniformes e de dificuldades de enraizamento, além de limitações sazonais, outras técnicas de cultivo vêm sendo pesquisadas.

A aplicação da técnica de micropropagação tem sido bastante eficiente, possibilitando a obtenção de elevado número de mudas sadias e homogêneas, em pequena área e em espaço de tempo relativamente curto. Todavia, torna-se necessário o estabelecimento de protocolos bem mais detalhados para o cultivo *in vitro* de diversas cultivares existentes, principalmente com relação aos fatores que interferem sobre a taxa de multiplicação.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência de concentrações do meio de cultura "MS" e sacarose, bem como avaliar o efeito de níveis de ágar e pH, na multiplicação *in vitro* das cultivares 'Hayward' e 'Matua'.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Aspectos fitotécnicos**

Originário da China, o kiwi ou quivi, encontra-se amplamente difundido em diversos países, especialmente na Nova Zelândia, onde representa o principal produto hortifrutícola de exportação (Cacioppo, 1989 e Vendramini, 1989).

Típico de clima temperado, requer determinado número de horas de frio, dependendo da cultivar, para quebra de dormência. Quando essas condições não são satisfeitas, estímulos adicionais através de aplicação de produtos químicos, visam compensar a falta de baixas temperaturas, garantindo a uniformização e aumento da brotação e, conseqüentemente, resulta em aumentos significativos na produtividade (Santos, 1990 e Schuck, 1994).

Os solos ideais para cultivo devem ser ricos em matéria orgânica, profundos, bem drenados e apresentar textura franca e pH em torno de 6,5 (Saquet e Brackmann, 1995).

No Brasil, a cultura foi introduzida na década de 70 pelo Instituto Agrônomo de Campinas (Junqueira, 1988). Atualmente, encontra-se expandida pelos Estados do Sul e Sudeste, sendo o seu cultivo desenvolvido em São Paulo (Ibiúna, Mogi das Cruzes e Campos do Jordão), Paraná (Castro), Santa Catarina (Campo Belo do Sul e Fraiburgo) e Rio Grande do Sul (Ivoti e Farroupilha), conforme Saquet e Brackmann (1995). Todavia, é no Rio Grande do Sul, particularmente na região serrana, que se concentra a maior safra nacional (Faertes, 1990).

Em São Paulo, os fruticultores têm utilizado o espaçamento 4 x 4, que resulta na densidade de 625 plantas/ha e produtividade de 300 a 400 frutos por planta adulta (Vendramini, 1989).

A produtividade média considerada boa é superior a 20 toneladas/ha, tendo potencial para alcançar 85 toneladas/ha, desde que os tratos culturais sejam corretos e as cultivares adequadas a cada região (Faertes, 1990).

As cultivares mais produtivas e plantadas são: 'Abbott', 'Allison', 'Bruno', 'Elmwood', 'Gracie', 'Greensil', 'Hayward', 'Jones' e 'Monty', como produtoras e 'Matua' e 'Tomuri', como polinizadoras (Cacioppo, 1989; Schuck, 1992a e Saquet e Brackmann, 1995).

A cultivar feminina mais utilizada nos principais países produtores é a 'Hayward', correspondendo a 95% de toda área plantada com kiwi. É tardia tanto na brotação como na floração (Schuck, 1992a). Desfruta dos melhores preços, além de apresentar maior aceitação no mercado internacional; porém, exige maior número de horas de frio com temperaturas abaixo de 7,2 °C durante o período de repouso (Saquet e Brackmann, 1995).

A cultivar 'Matua' possui período de floração longo e abundante em flores. A floração começa cedo, estendendo-se até o final da florada da maioria das cultivares femininas, sendo considerada portanto, a polinizadora mais utilizada (Schuck, 1992a).

Como o kiwi é uma espécie dióica, o plantio deverá ser intercalado com cultivares masculinas para que ocorra produção satisfatória. Para tanto, recomenda-se plantar grupo de 6 a 8 plantas femininas para cada polinizante (Junqueira, 1988 e Vendramini, 1989).

Outra técnica utilizada pelos fruticultores consiste em enxertar um galho masculino em cada planta feminina adulta para melhor controle da polinização (Vendramini, 1989).

A maioria das mudas plantadas no país são procedentes do Chile, uma vez que as nacionais são produzidas em menor escala e além disso, oferecem pouca segurança quanto à qualidade (Faertes, 1990).

O kiwi pode ser propagado vegetativamente através de diferentes métodos. Porém, a produção comercial de mudas, normalmente é realizada pelos processos de enxertia e estaquia.

Os dois tipos de enxertia mais empregados são: enxertia a campo (Peruzzo e Dal Bó, 1992) e a enxertia de mesa. No primeiro caso, a garfagem simples é preferencialmente utilizada. Já na enxertia de mesa utiliza-se a garfagem simples ou de dupla fenda (Cacioppo, 1989 e Schuck, 1992b).

Na propagação por estaquia utiliza-se estacas lenhosas, semi lenhosas (Tomioka, 1995), herbáceas e de raízes (Schuck, 1992b).

Em se tratando de trepadeira, as plantas necessitam de tutoramento, sendo portanto, conduzidas em forma de pérgola ou latada, espaldeira e cruzeta (Santos, 1990). No Sul do Brasil, tem-se utilizado o sistema de latada por ser bastante conhecido pelos viticultores da região (Saquet e Brackmann, 1995).

Além de irrigações frequentes e uso de quebra-vento, as podas são imprescindíveis para o bom desenvolvimento da cultura e aumento da produção, sendo a de verão e a de inverno as mais importantes (Faertes, 1990).

## **2.2 Cultivo *in vitro* de kiwi**

A indústria da micropropagação de frutíferas tem-se destacado, particularmente na Europa e América do Norte, principalmente na produção clonal de porta-enxertos de difícil propagação pelos métodos tradicionais; o número de espécies propagadas *in vitro* está cada vez mais se expandindo (Fiorino e Loreti, 1987). Conforme os mesmos autores, a micropropagação comercial de espécies frutíferas foi desenvolvida pelas seguintes razões:

- a) possibilita a obtenção de grande número plantas a partir de um único indivíduo;
- b) multiplicação de plantas livres de patógenos em curto período e em pequeno espaço;

c) adequação da taxa de produção de acordo com o viveiro ou as necessidades de mercado, uma vez que os propágulos cultivados *in vitro* não dependem de um ciclo vegetativo *in vivo*.

O cultivo *in vitro* das espécies de *Actinidia* tem sido amplamente estudado, tanto do ponto de vista econômico, como nos aspectos genéticos, bioquímicos e fisiológicos.

Segundo Piagnani, Eccher e Castelli (1986) e Revilla et al. (1992), vários laboratórios comerciais vêm utilizando a técnica de micropropagação para produção de mudas de kiwi em larga escala. Apesar de ser uma técnica bastante dispendiosa em relação aos métodos convencionais de propagação vegetativa, tende a suprir a grande demanda de material necessário para instalação de pomares. Além do mais, a importação de elevada quantidade de mudas idôneas tem levantado certa desconfiança com relação à qualidade (Wessels, Nel e Staden, 1984); com o emprego da propagação *in vitro*, um grande número de plantas homogêneas poderá ser rapidamente obtido, sendo exigido apenas uma mínima quantidade de material primário, ao contrário dos métodos convencionais (Wiyaporn, Subhadrabandhu e Sahavacharin, 1990 e Shen, Wan e Luo, 1990). O método é ainda eficaz para a obtenção e multiplicação de novos clones e variedades selecionadas (Wessels, Nel e Staden, 1984 e Shen, Wan e Luo, 1990), os quais poderão ser empregados em programas de melhoramento (Shen, Wan e Luo, 1990).

Para o emprego da técnica em larga escala, recomenda-se checar e comparar, em campo, o comportamento de plantas micropropagadas com o de plantas originadas convencionalmente (Kovac, 1993). Além do mais, é bastante desejável que o enraizamento e aclimatação ocorram simultaneamente (Monette, 1986; Sutter, Shackel e Diaz, 1992 e Zecca e Fortes, 1993), constituindo assim, um método mais rápido e econômico (Kovac, 1993).

A morfogênese *in vitro* de kiwi, pode ser induzida através do uso de diferentes explantes, tais como: segmento nodal (Gui, 1979; Kamenická e Rypák, 1989 e Pedroso, Oliveira e Pais, 1992), gema axilar (Wessels, Nel e Staden, 1984 e Shen, Wan e Luo, 1990), folha (Canhoto e Cruz, 1987; Xiao, Hirsch e Fortune, 1991; Fortes et al., 1992; Radice, 1992 e Moraes et al., 1993), cotilédone e endosperma (Mu, Fraser

e Harvey, 1992). A regeneração de brotações de kiwi a partir de raízes *in vitro* (Chiariotti, Caboni e Frattarelli, 1991) e pecíolo (Pais, Oliveira e Barroso, 1987; Revilla e Power, 1988 e González et al., 1990) também tem sido demonstrada.

A regeneração de plântulas através da cultura de calos (Leva, 1986; Barbieri e Morini, 1987; Muleo e Morini, 1990; Sammarcelli e Legave, 1990 e Rey et al., 1992) não é um método eficiente para a propagação *in vitro*, uma vez que variações somaclonais (Marino e Battistini, 1990 e Hirsch et al., 1991) podem ocorrer, comprometendo a estabilidade genética do material, ao contrário de plantas que são obtidas por organogênese direta ou por embriogênese somática (Wang, Gui e Sun, 1988 e Oliveira e Pais, 1992).

Tradicionalmente, a obtenção de variedades melhoradas de kiwi é bastante problemática devido à estreita base genética encontrada no centro de diversidade (Marino e Battistini, 1990). Visando à seleção de mutantes com estrutura genética estável, Sammarcelli-Ollitrault e Legave (1991) estudaram o efeito de doses crescentes de raios gama quando aplicadas em explantes de kiwi *in vitro*.

Recentemente, com o desenvolvimento da técnica de cultura de protoplastos vegetais, as plantas assim regeneradas permitem o uso de técnicas de transformação genética tão bem quanto as de hibridação e cibridação (Oliveira e Pais, 1991), tornando possível o melhoramento não convencional desta espécie (Mii e Ohashi, 1988 e Oliveira e Pais, 1991).

## **2.3 Caracterização do meio de cultura**

### **2.3.1 Nutrientes**

Os meios de cultura são normalmente compostos de sais inorgânicos, substâncias orgânicas e complexos naturais (Murashige, 1974), fundamentalmente importantes para as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células, fornecendo substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento de órgãos vegetais *in vitro* (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990).

Várias formulações básicas têm sido desenvolvidas; todavia, o meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) é o mais empregado em experimentos acadêmicos (Smith, 1992) e na maioria dos processos de micropropagação. Neste, grande parte das plantas tem mostrado crescimento e desenvolvimento satisfatórios (Pierik, 1987). Às vezes, algumas modificações são necessárias de acordo com a espécie e objetivos (Murashige, 1974).

Os minerais, segundo Pierik (1987), representam, depois da sacarose, o grupo mais importante do meio de cultura. Geralmente, a concentração de macronutrientes é a que mais sofre variações na tentativa de alcançar uma taxa de multiplicação adequada. A fonte de nitrogênio, por poder apresentar-se sob a forma de cátion (amônio) e ânion (nitrito e nitrato), tem sido de maior relevância.

Mezzetti, Rosati e Casalicchio (1991) constataram em seus estudos variações na composição mineral do meio e nas diferentes partes do explante após o período de cultivo. De acordo com Singha, Oberly e Townsend (1987), o estado nutricional do explante pode ser prejudicado tanto pela falta de absorção, como pela diminuição de nutrientes do meio.

Em kiwi, o desenvolvimento de um sistema radicular favorável em brotações da cultivar 'Bruno' foi conseguido com a redução em 50% da concentração do meio MS (Wiyaporn, Subhadrabandhu e Sahavacharin, 1990).

A alta concentração de sais presentes no meio MS promoveu maior percentagem de brotações vitrificadas de *Amelanchier arborea* Michx. f. (Brand, 1993). Problemas como este podem ser superados através da redução da concentração de nitrogênio na forma amoniacal (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990 e Grattapaglia e Machado, 1990).

### **2.3.2 Carboidrato**

As células verdes *in vitro* requerem uma fonte de energia exógena essencial para sustentar o crescimento e desenvolvimento, já que estas não dispõem

adequadamente de condições favoráveis para a realização da fotossíntese (Pierik, 1987; Grattapaglia e Machado, 1990 e Smith, 1992).

Vários autores têm pesquisado a função de diferentes fontes de carbono, como agentes osmóticos, na regulação da organogênese *in vitro* (Chong e Pua, 1985; Leva, 1986; Tremblay e Tremblay, 1991 e Leva e Muleo, 1993). Porém, a sacarose tem sido mais utilizada na maioria das vezes. A faixa de concentração normalmente empregada varia de 1 a 5% (Pierik, 1987). Abaixo disso, ocorre clorose generalizada e acima, excessivo potencial osmótico, deteriorando as culturas (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990 e Grattapaglia e Machado, 1990).

De acordo com Pierik (1987), os carboidratos podem sofrer variações com a autoclavagem. A caramelização ou hidrólise, devido à autoclavagem excessiva, ocorre quando os açúcares são degradados, conferindo uma coloração escura ao meio, devido à formação de compostos escuros e de alto peso molecular, capazes de inibir o crescimento celular (Smith, 1992). A autoclavagem, conforme Mezzetti, Conte e Rosati (1991), hidrolisa uma pequena parte da sacarose inicial em glicose e frutose; todavia não ocasiona qualquer redução no teor total de carboidratos do meio (Singha, Oberly e Townsend, 1987).

Visando aumentar a capacidade fotossintética *in vitro* em culturas de brotações de roseira, Langford e Wainwright (1987) procuraram reduzir a concentração de sacarose no meio nutritivo. Entretanto, não apenas o crescimento foi afetado desfavoravelmente pelas concentrações inferiores, mas também a incidência de vitrificação acarretou vários problemas e reduziu o número de brotações capazes de sobreviver. Observaram ainda uma diminuição da absorção de CO<sub>2</sub>, quando comparada com as brotações mantidas em concentrações mais elevadas de sacarose.

O crescimento normal de brotações do porta-enxerto de macieira 'Ottawa 3', ocorreu quando o meio foi suplementado com 30 g/l de sacarose, conforme Chong e Pua (1985). Esta concentração, bem como a de 20 g/l foram estabelecidas por Langford e Wainwright (1987) como níveis ótimos para garantir o crescimento saudável de brotações de roseira. Estes mesmos autores verificaram que tanto altas quanto baixas concentrações de sacarose têm mostrado causar irregularidades no crescimento e desenvolvimento *in vitro*.

Visando estimular o enraizamento de brotações *in vitro* de kiwi, Wessels, Nel e Staden (1984) reduziram a concentração de sacarose. O mesmo não ocorreu com brotações de roseira, as quais apresentaram maior número e comprimento de raízes quando cultivadas em meios com alta concentração de sacarose (Hyndman, Hasegawa e Bressan, 1982). De acordo com esses autores, houve claramente uma interação entre sacarose e nitrogênio, e que portanto, num meio cuja relação sacarose e nitrogênio é alta, há a indução ao enraizamento, caso contrário, a rizogênese é desfavorecida.

### 2.3.3 Agente solidificante

Na maioria das vezes, a consistência do meio pode determinar o sucesso ou fracasso do crescimento e desenvolvimento *in vitro* de uma dada espécie (Murashige, 1974).

O ágar é o agente comumente utilizado na solidificação dos meios de cultura (Singha, 1984 e George, 1993). George (1993) atribui isto às seguintes vantagens: uma vez adicionado à água, forma um colóide, que submetido a 100°C torna-se líquido e solidifica-se a 45°C, mantendo-se estável nas temperaturas de incubação. Além do mais, o ágar não é digerido pelas enzimas vegetais e não reage com os constituintes do meio.

Existem diversas marcas comerciais de ágar (Singha, 1984; Pierik, 1987; Smith, 1992 e George, 1993), que frequentemente são utilizadas em concentrações que variam de 0,4 a 1,0% (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990 e Grattapaglia e Machado, 1990). Na maior parte dos experimentos tem-se utilizado de 0,7 a 1,0%, de acordo com a marca (George, 1993); porém, recomenda-se minimizá-lo ou procurar otimizá-lo no preparo do meio, visto que o ágar é considerado o componente de custo mais elevado do meio de cultura (Singha, 1984; George, 1993 e Peixoto e Pasqual, 1995).

Devido à presença de inibidores orgânicos e inorgânicos associados ao ágar (Pierik, 1987), tanto a qualidade como a concentração de ágar afetam as

características químicas e físicas do meio de cultura (Debergh, 1983), e conseqüentemente o crescimento do explante *in vitro* (Romberger e Tabor, 1971).

Agentes solidificantes como polímeros sintéticos, Gelrite, agarose, entre outros, têm sido propostos como forma alternativa para a substituição do ágar (Pasqualetto, Zimmerman e Fordham, 1986; Pierik, 1987 e George, 1993), visando maior economicidade e melhor qualidade do meio.

Os meios sólidos ou semi-sólidos são mais comuns na fase de multiplicação. Os meios líquidos, apesar de serem homogêneos, de preparo rápido e menor custo pela ausência do ágar, neles há a necessidade de se utilizar suporte físico ou sistema de agitação para fornecer oxigênio suficiente para a respiração do explante (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990 e Grattapaglia e Machado, 1990).

O aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pelos explantes foi observado por Singha (1982), quando estes foram colocados em meios líquido e semi-sólido. Os melhores resultados alcançados nestes meios ocorrem devido a maior facilidade de absorção de nutrientes e reguladores de crescimento, e também ao maior contato entre explante e meio, ao contrário de meios mais sólidos, onde há somente contato basal, e além do mais, qualquer exsudato proveniente do explante é mais facilmente diluído do que em meio com ágar, evitando desta maneira o acúmulo de tais compostos tóxicos (Pierik, 1987).

Monette (1986) obteve melhores resultados quanto ao número de brotações de kiwi, em meio líquido, em comparação com meios solidificados; no entanto, estes apresentaram-se aparentemente vítreos, mas não demonstraram nenhum problema nas fases de enraizamento e aclimatação. Singha (1984); Singha, Oberly e Townsend (1987); Ghashghaie, Brenckmann e Saugier (1991) e Peixoto e Pasqual (1995), também observaram a ocorrência de vitrificação dos explantes em meios líquido ou menos geleificados, os quais apresentaram-se com desenvolvimento anormal, resultando em plantas menos vigorosas, com folhas grandes, translúcidas e haste lenhosa.

A vitrificação é um distúrbio fisiológico que normalmente ocorre em plantas cultivadas *in vitro* (Kevers et al., 1984), e é bastante comum em meios líquidos ou com

baixa concentração de ágar, ou seja, quando a planta tem grande disponibilidade de água (Pierik, 1987).

Vários autores verificaram o decréscimo da porcentagem de explantes vitrificados quando a concentração de agente solidificante foi aumentada no meio de cultura (Debergh, 1983; Pasqualetto, Zimmerman e Fordham, 1986; Pasqualetto Zimmerman e Fordham, 1988; Grattapaglia e Machado, 1990 e Brand, 1993), ocorrendo porém uma significativa redução na multiplicação e crescimento de brotações. Isto pode ser explicado pela disponibilidade de citocinina que, segundo Debergh (1983), diminui com o aumento da concentração de ágar. Já em condições de baixa concentração de ágar ou de alto potencial matricial, as citocininas são responsáveis pela vitrificação. A literatura também sugere fazer combinações entre diferentes agentes solidificantes, como por exemplo, o uso de Gelrite mais ágar, que além de evitar a vitrificação, essa combinação não promoveu a redução da proliferação de brotações de macieira 'Gala' (Pasqualetto, Zimmerman e Fordham, 1986).

As concentrações de ágar mais elevadas dificultam o contato do explante com o meio, limitando a absorção de compostos (Pierik, 1987), fato este também observado por Oliveira (1994) em microestacas de crisântemo. Peixoto e Pasqual (1995) e Singha (1982) verificaram ainda que o aumento da concentração de ágar não foi prejudicial só à taxa de multiplicação das brotações, mas também ao crescimento; além disso os valores dos pesos da matéria fresca e seca foram fortemente reduzidos (Singha, 1984). O mesmo foi constatado com o ganho relativo de peso fresco das culturas de ápices de brotações de kiwi (Monette, 1986).

Para a obtenção de uma consistência adequada, a concentração de ágar necessária varia conforme o tipo de explante a ser cultivado, a qualidade do ágar e o pH do meio (Murashige, 1974). Geralmente, as concentrações mais baixas (inferiores a 0,4%), associadas principalmente a níveis de pH mais ácidos, resultam em meios menos sólidos ou até mesmo líquido (Murashige, 1974 e Pierik, 1987), isto porque após a autoclavagem, a polimerização do ágar é bastante reduzida em níveis de pH mais baixos (principalmente abaixo de 4,5, segundo Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990 e George, 1993). Mesmo utilizando uma concentração intermediária de ágar

(0,6%), associada a níveis de pH inferiores, Pierik (1987) notou que o meio não se solidifica adequadamente.

Em uma variedade de crisântemo, estudada por Oliveira (1994), houve uma boa adaptação tanto em meio líquido como nos meios semi-sólido e sólido, sendo o número de raízes formadas bastante semelhante nas diversas concentrações empregadas.

Os melhores resultados de multiplicação e crescimento de brotações de macieira foram obtidos quando utilizou-se 0,3% de ágar (Singha, 1982 e Singha, 1984). Nesta concentração, os explantes ficam sobrenadantes ou parcialmente submersos no meio, o que favorece um bom contato entre ambos, porém isto pode resultar na formação de brotações invertidas (Oliveira, 1994), ou ainda, suculentas e mais frágeis (Singha, 1984).

### 2.3.4 pH

Considerado outro fator crítico do meio de cultura (Murashige, 1974), o pH influencia na disponibilidade de nutrientes, fitorreguladores e no grau de solidificação do ágar (Grattapaglia e Machado, 1990).

Usualmente, o pH é ajustado numa faixa que varia de 5,0 a 6,5 (Pierik, 1987), para o crescimento adequado da maioria das espécies, sendo que em níveis inferiores a 4,5 e superiores a 7,0, geralmente ocorre paralisação do crescimento e do desenvolvimento *in vitro* (Murashige, 1974). Segundo Marino e Battistini (1990), a regeneração e a sobrevivência de brotações de *A. deliciosa* foram intensamente reduzidas em níveis de pH acima de 5,7. Entretanto, as melhores respostas de crescimento do calo foram encontradas nos níveis 7,0 e 7,5.

O ajuste do pH do meio de cultura, normalmente é realizado com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl), quando são desejados meios mais alcalinos ou mais ácidos, respectivamente (Pierik, 1987).

A esterilização por autoclavagem ocasiona variações no pH do meio de cultura. Skirvin et al. (1986) constataram redução de 0,3 a 0,5 unidades no valor do pH

ajustado inicialmente, antes e após o processo de autoclavagem. Diante disso, Pasqual, Ribeiro e Barros (1992) recomendam ajustá-lo em 0,4 a 0,5 unidades acima, para que após a autoclavagem, o nível do pH final corresponda ao desejado.

Mezzetti, Rosati e Casalicchio (1991) também comprovaram pequeno declínio do pH após a autoclavagem do meio, o qual permaneceu estável na ausência de explantes e, quando estes estavam presentes, a queda foi mais pronunciada na primeira metade do período de cultivo, apresentando leve aumento, atingindo quase o valor inicial no final do período de cultivo (Singha, Oberly e Townsend, 1987 e Mezzetti, Rosati e Casalicchio, 1991).

A variação do pH, de acordo com George (1993) é devido à absorção relativa de cátions ( $\text{NH}_4^+$ ) e ânions ( $\text{NO}_3^-$ ) e também, à presença de explantes (Mezzetti, Rosati e Casalicchio, 1991). A absorção de íons carregados negativamente é favorecida em soluções relativamente ácidas, enquanto que a de íons positivos é melhor em soluções levemente ácidas ou alcalinas. A liberação de íons de hidroxil ( $\text{OH}^-$ ) pela planta, na troca por íons de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), resulta em meios mais alcalinos; todavia, quando íons de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) são absorvidos, na troca, prótons ( $\text{H}^+$ ) são expulsos pela planta e os meios tornam-se mais ácidos (George, 1993).

Dependendo da concentração de ágar, o meio poderá tornar-se líquido se ocorrer absorção preferencial de  $\text{NH}_4^+$  (Pierik, 1987), uma vez que, com o abaixamento do pH (4 a 4,5), o meio não se solidificará adequadamente após a autoclavagem (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990 e George, 1993).

### 2.3.5 Fitorreguladores

Também denominados reguladores de crescimento, os fitorreguladores são de fundamental importância para a multiplicação *in vitro* de várias espécies.

Na maioria das vezes, são empregados compostos de ação citocinínica, os quais promovem a divisão celular, estimulando o crescimento e o desenvolvimento de brotações adventícias, devido à diminuição da dominância apical e ao retardamento da

senescência (Pierik, 1987). Entretanto, mais estudos são necessários, procurando estabelecer tipo e concentração a serem usados.

Dentro da classe das citocininas, o BAP (6-Benzilaminopurina) tem sido mais utilizado na multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias, além de apresentar custo mais acessível em relação às demais (Grattapaglia e Machado, 1990).

Segundo Wessels, Nel e Staden (1984), o BAP propiciou os melhores resultados quanto ao número e comprimento de brotações, quando comparado com outros reguladores de crescimento. Esses autores, assim como Monette (1986), estabeleceram a concentração de 2,0 mg/l, como sendo mais eficiente para a cultivar 'Hayward'. Já Zecca et al. (1993) e Nachtigal et al. (1995) determinaram a faixa de 1,5 a 2,0 mg/l como mais favorável no cultivo *in vitro* da cultivar 'Tomuri'.

Marino e Bertazza (1990) trabalhando com as cultivares 'Hayward' e 'Tomuri', também observaram que o BAP induziu as melhores respostas, embora ocasionalmente, tenha ocorrido sintomas de vitrificação em folhas mais velhas.

O comprimento de brotações das cultivares 'Tomuri' e 'Monty' decresceu constantemente com aumento da concentração de BAP, enquanto que o das cultivares, 'Abbott', 'Bruno' e 'Hayward', cuja taxa de multiplicação foi reduzida em concentrações mais altas, mostrou tendência em aumentar. Todavia, as concentrações mais elevadas foram responsáveis pela vitrificação (Piagnani, Eccher e Castelli, 1986).

Outro regulador de crescimento que vem sendo utilizado na micropropagação de kiwi é o Thidiazuron (TDZ). De acordo com Fortes et al. (1993), maior número de brotações e folha da cultivar 'Matua' foi obtido em meios contendo concentrações mais elevadas de TDZ. O Thidiazuron também estimulou efetivamente a proliferação de brotações de macieira (Nieuwkerk e Zimmerman, 1986) e videira (Gribaudo e Fronda, 1991).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - UFLA, em Lavras, Minas Gerais.

Como fonte de explante utilizou-se as cultivares 'Hayward' e 'Matua', as quais já se encontravam estabelecidas *in vitro*.

O meio básico utilizado foi o "MS" (Murashige e Skoog, 1962) (Tabela 1A), suplementado com 2,0 mg/l de 6-benzilaminopurina (BAP), previamente determinados para maximização da multiplicação de brotações (Wessels, Nel e Staden, 1984 e Monette, 1986).

O pH dos meios de cultura foi ajustado, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) a 0,1 ou 1,0 N, antes da adição de ágar (ÁGAR-ÁGAR-Vetec Química e Representações Ltda). Nos tratamentos (ensaios 3 e 4) não solidificados com ágar (meio líquido), empregou-se pontes de papel de filtro para a sustentação dos explantes.

Após o preparo, aproximadamente 15 ml de meio foram distribuídos em tubos de ensaio (25 × 150 mm) e logo em seguida, os tubos foram convenientemente tampados, e submetidos ao processo de esterilização por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos.

A inoculação foi realizada assepticamente em câmara de fluxo laminar horizontal, onde cada tubo recebeu uma microestaca apical contendo três gemas. Posteriormente, os ensaios foram incubados em sala de crescimento com temperatura

de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 2500 lux, suprida por lâmpadas, Gro-lux e Branca-fria, na proporção de 1:1.

### **3.1 Ensaios 1 e 2: Influência da concentração do meio de cultura (MS) e de sacarose na multiplicação *in vitro* das cultivares 'Hayward' e 'Matua'**

Foram instalados dois ensaios com a mesma estrutura, sendo que no primeiro utilizou-se a cultivar 'Hayward', e no segundo, a 'Matua'.

Os tratamentos foram constituídos de todas as combinações possíveis entre concentrações determinadas do meio MS (0, 50, 100, 150 e 200%) (Tabela 2A) e de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g/l), resultando num esquema fatorial  $5 \times 5$ , e dispostos em um delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições, sendo cada uma composta por 4 tubos. Todos esses tratamentos foram suplementados com 2,0 mg/l de BAP, sendo ainda o pH ajustado para 6,0 e os mesmos solidificados com 0,7% de ágar.

Aos 45 dias após a instalação foram efetuadas as avaliações, sendo analisadas as seguintes variáveis: número de brotações, comprimento de brotações (cm) e peso da matéria seca da parte aérea de brotações (g).

### **3.2 Ensaios 3 e 4: Influência da concentração de ágar e do nível de pH na multiplicação *in vitro* das cultivares 'Hayward' e 'Matua'**

De maneira idêntica ao item anterior, foram também conduzidos dois ensaios, de estrutura semelhante, utilizando as mesmas cultivares já mencionadas.

Em ambos os ensaios empregou-se o meio MS total (100%) adicionado de 30 g/l de sacarose e suplementado com 2,0 mg/l de BAP. Adotou-se o delineamento inteiramente ao acaso com 4 repetições, em esquema fatorial  $5 \times 6$ , onde as concentrações de ágar (0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0%) foram combinadas com os níveis de pH (3,7; 4,7; 5,7; 6,7 e 7,7). A parcela experimental foi constituída de 4 tubos de ensaio, sendo um explante por tubo.

Após os 45 dias de cultivo, avaliou-se o número de brotações, o comprimento de brotações (cm) e o peso da matéria seca da parte aérea de brotações (g).

### 3.3 Análises estatísticas

Com os dados obtidos, foram realizados testes de normalidade (Teste de Lilliefors) e de homogeneidade de variância (Testes de Cochran e Bartlett) e, quando necessário, os dados foram transformados para atender às pressuposições da análise de variância.

Quando detectadas diferenças significativas entre as médias dos tratamentos, pelo teste F, estas foram utilizadas para ajustar modelos de superfície de resposta (Box e Draper, 1987). Neste caso, o método de 'backward' (Draper e Smith, 1981) foi utilizado para a seleção de modelos de regressão múltipla envolvendo os fatores testados em cada ensaio, usando para tanto o resíduo da análise de variância para testar a significância dos coeficientes de regressão.

Os modelos de regressão inicialmente utilizados no método de 'backward' foram os seguintes:

$Y = a + b_1X_2 + b_2X_1 + b_3X_2 + b_4X_1 + b_5(X_1 \times X_2) + b_6(X_1 \times X_2)$  (modelo de regressão referente aos ensaios 1 e 2) e

$Y = a + b_1X_2 + b_2X_1 + b_3X_2 + b_4X_1 + b_5(X_1 \times X_2) + b_6(X_1 \times X_2) + b_7(X_1 \times X_2) + b_8X_2^{-1}$  (modelo de regressão referente aos ensaios 3 e 4),

onde:

Y = variável resposta

a = intercepto

$b_j$  = coeficiente de regressão associado à característica j.

$X_i$  = variável independente ( $X_1$  = MS ou ágar e  $X_2$  = sacarose ou pH, conforme o ensaio).

Nas situações em que o procedimento de 'backward' não foi suficiente para promover bons ajustes, então novos parâmetros de regressão foram incorporados aos modelos de superfície de resposta, associados a, por exemplo:  $(X_1 \times X_2^2)$ ,  $\sqrt{X_1}$ ,  $\sqrt{X_2}$  e  $\sqrt{(X_1 \times X_2)}$ , relativos aos ensaios 1 e 2 e,  $\sqrt{X_1}$ ,  $X_1^3$ ,  $X_2^3$ ,  $\sqrt{(X_1 \times X_2)}$  e  $\sqrt{(X_1^2 \times X_2)}$ , relativos aos ensaios 3 e 4.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Ensaios 1 e 2: Influência da concentração do meio de cultura (MS) e de sacarose na multiplicação *in vitro* das cultivares 'Hayward' e 'Matua'**

Nos dois ensaios, ou seja, tanto com a cultivar feminina como com a masculina, houve baixo vigor em tratamentos, quando o meio era constituído simplesmente de água e ágar, assim como naqueles não suplementados com sacarose. A taxa de multiplicação ficou totalmente comprometida nestes meios, uma vez que os explantes tornaram-se completamente cloróticos e vitrificados, sendo o desenvolvimento paralisado. A omissão da sacarose do meio de cultura também causou rapidamente o aparecimento de clorose em cultivares de roseiras, as quais apresentaram crescimento baixo ou até mesmo ausente, acarretando morte das brotações (Langford e Wainwright, 1987). Normalmente, somente a gema apical pareceu manter-se viva, sendo que as demais acabaram senescendo ao final do período de cultivo. A possibilidade de sobrevivência e a capacidade de crescimento na ausência de nutrientes e sacarose, podem estar associadas à existência de reservas no próprio explante (Grattapaglia e Machado, 1990 e Oliveira, 1994), as quais são suficientes apenas para dar início ao desenvolvimento.

A redução da concentração do meio MS em 50% resultou em brotações com coloração verde mais suave, quando confrontadas com as obtidas em concentrações superiores a esta. E, de modo geral, a maioria dos tratamentos suplementados com 15 g/l de sacarose apresentou brotações pequenas, com folhas filiformes e pilosidade reduzida, sendo ainda visíveis sintomas de clorose e vitrificação.

Langford e Wainwright (1987) também constataram que, em concentrações inferiores de sacarose (10 g/l), os explantes de roseiras mostraram-se vitrificados e pouco alongados e, de acordo com Caldas, Haridasan e Ferreira (1990) e Grattapaglia e Machado (1990), nessas concentrações as brotações ficam sujeitas à clorose generalizada. Portanto, pode-se admitir que tanto a concentração de nutrientes como a de carboidratos reflete no estado nutricional do explante, afetando o seu aspecto visual e vigor.

A Tabela 1 apresenta o resumo da análise de variância para as características estudadas. Pode-se observar que todas elas, na micropropagação da cultivar 'Hayward', foram significativamente influenciadas pela interação entre o meio MS e a sacarose. Entretanto, para a cultivar 'Matua', a interação entre os dois fatores foi apenas significativa para o comprimento e PMSPA de brotações (Tabela 2).

Nas mesmas Tabelas 1 e 2, estão apresentados os resumos das análises de variância referentes aos modelos de regressão múltipla ajustados a partir das médias dos tratamentos. A Tabela 1 mostra que os desvios de regressão para as características avaliadas no cultivo *in vitro* da cultivar feminina, foram altamente significativos. Este tipo de resultado é indesejado, pois refletiu a existência de variações significativas entre os tratamentos, não captadas pelos modelos de regressão, apesar das numerosas tentativas de inclusão de parâmetros para melhoria de ajuste. Apesar disso, análises de resíduos foram feitas nesses casos, para verificar a validade dos modelos, apesar da significância dos desvios de regressão. Com relação à cultivar masculina, tal problema não aconteceu, conforme se observa na Tabela 2.

TABELA 1. Resumo das análises de variância para número de brotações (NB), comprimento de brotações (CB) e peso da matéria seca da parte aérea (PMSPA) de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração do meio MS e de sacarose, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

Causas da variação	G.L.	NB <sup>1/</sup>		CB <sup>1/</sup>		PMSPA <sup>1/</sup>	
		Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	
MS	4	1,1149013 **	4	0,0184832 **	4	0,0409585 **	
Sacarose	4	1,7351385 **	4	0,0871118 **	4	0,0942037 **	
MS x Sacarose	16	0,0940945 **	16	0,0412776 **	16	0,0038115 **	
Tratamentos	24	0,5377363 **	24	0,0451176 **	24	0,0250681 **	
Regressão	6	1,5939733 **	8	0,0749650 **	6	0,0906533 **	
Desvio	18	0,1856573 **	16	0,0301939 **	18	0,0032063 **	
Resíduo	75	0,0208363	75	0,0036540	75	0,0003785	
C.V.(%)		9,129		6,406		11,968	

<sup>1/</sup> Observações transformadas segundo  $\sqrt{(X)}$ .

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 2. Resumo das análises de variância para número de brotações (NB), comprimento de brotações (CB) e peso da matéria seca da parte aérea (PMSPA) de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração do meio MS e de sacarose, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

Causas da variação	G.L.	NB <sup>1/</sup>		CB		PMSPA <sup>2/</sup>	
		Q.M.		Q.M.		Q.M.	
MS	4	0,5641323 **	4	1,3668417 **	4	0,0173781 **	
Sacarose	4	0,6806969 **	4	0,4455942 **	4	0,0509624 **	
MS x Sacarose	16	0,0322380 <sup>ns</sup>	16	0,0429246 **	16	0,0011728 *	
Tratamentos	24	0,2289635 **	24	0,3306890 **	24	0,0121719 **	
Regressão	4	1,1995500 **	5	1,4968560 **	6	0,0477200 **	
Desvio	20	0,0348462 <sup>ns</sup>	19	0,0238030 <sup>ns</sup>	18	0,0003226 <sup>ns</sup>	
Resíduo	75	0,0309296	75	0,0176783	75	0,0005212	
C.V.(%)		9,135		19,795		16,665	

<sup>1/</sup> Observações transformadas segundo  $\sqrt{(X+0,5)}$ .

<sup>2/</sup> Observações transformadas segundo  $\sqrt{(X)}$ .

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>ns</sup> Não significativo

#### 4.1.1 Número de brotações

A redução, assim como o aumento excessivos da concentração, tanto do meio MS como de sacarose, foram responsáveis pela diminuição do número de brotações da cultivar 'Hayward'. Pôde-se notar que as concentrações intermediárias de ambos os fatores, quando combinadas, resultaram nas maiores taxas de multiplicação.

De acordo com o modelo de superfície de resposta ajustado, o número máximo de brotações poderia ser obtido em meio contendo 117,31% da concentração básica dos componentes do meio MS, sendo este adicionado de 36,10 g/l de sacarose. Nesta combinação seriam produzidas 4,28 brotações por explante (Fig. 1). O mesmo pode ser observado através do diagrama de contornos (Fig. 2). Como o desvio de regressão desse modelo foi altamente significativo (Tabela 1), a análise de resíduos é apresentada em função da concentração do meio MS (Fig. 3) e de sacarose (Fig. 4). Nestas análises, como não se observa uma tendência muito marcante de queda ou ascensão contínuas, o modelo de superfície foi tido como satisfatório.

Conforme mencionado anteriormente, não houve interação entre as concentrações do meio MS e de sacarose, para a variável número de brotações da cultivar 'Matua' (Tabela 2), o que pode ser claramente comprovado pelo modelo de regressão múltipla ajustado (Fig. 5), uma vez que este não apresentou termos contendo os dois fatores simultaneamente. Além disso, a inexistência de interação significativa também pôde ser observada na Figura 6, que contém o diagrama de contornos, no qual houve a tendência dos eixos dos elipsóides manterem-se paralelos aos eixos das variáveis independentes.

À proporção que a concentração de MS foi aumentada ou reduzida, ocorreu diminuição do número de brotações para a cultivar 'Matua'. Esta redução foi também demonstrada na ausência de sacarose e quando esta foi adicionada em concentrações crescentes. Para esta cultivar, o máximo de brotações poderia ser encontrado na combinação de concentrações intermediárias do meio MS com concentrações reduzidas de sacarose. O maior número de brotações da cultivar 'Matua', estimado pelo modelo ajustado, seria obtido em meio contendo 98,46% da concentração de MS e 13,90 g/l de sacarose, sendo produzidas 4,56 brotações, conforme representado pelas Figuras 5 e 6. Apesar desta combinação ter proporcionado maior quantidade de brotações, os meios suplementados com baixa concentração de sacarose (15 g/l) apresentaram algumas inconveniências, as quais já foram relatadas anteriormente.

O fato da cultivar 'Matua' ter sido mais responsiva em baixa concentração de sacarose, contraria o que foi observado por Langford e Wainwright (1987), os quais

$$Y = 0,982805 + 0,341219X_2 + 0,006554X_1 - 0,056307X_2^2 - 0,000030322X_1^2 + 0,000966(X_1 \times X_2) - 0,000003457(X_1^2 \times X_2)$$

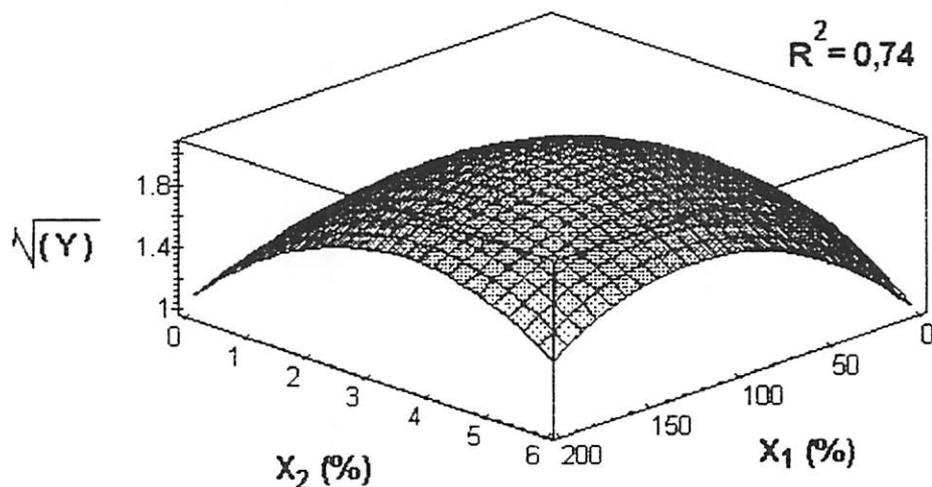


FIGURA 1. Superfície de resposta para número de brotações da cultivar 'Hayward' ( $\sqrt{Y}$ ), em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

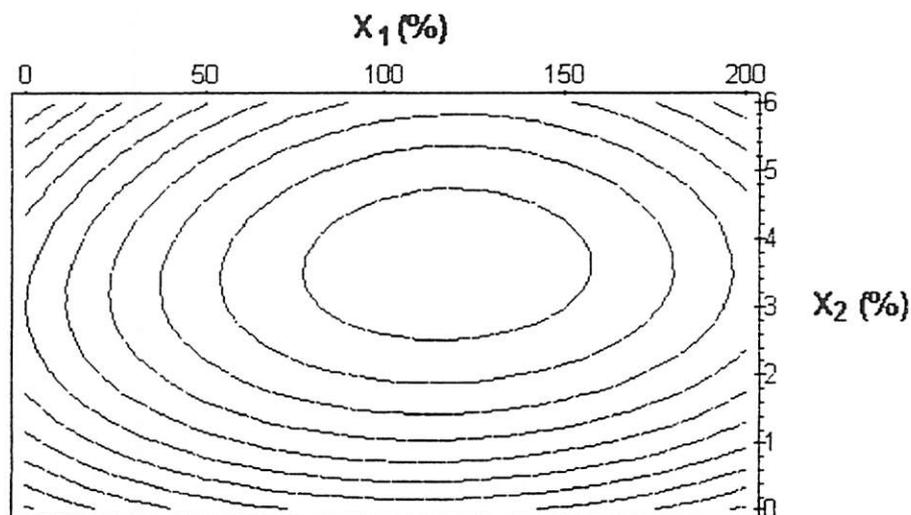


FIGURA 2. Diagrama de contornos para número de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

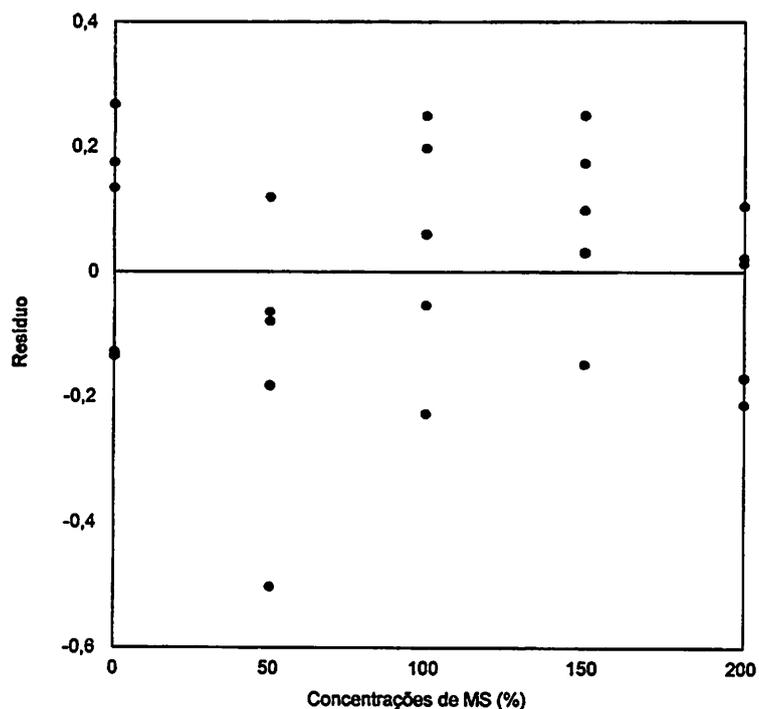


FIGURA 3. Análise de resíduos para número de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração do meio MS, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

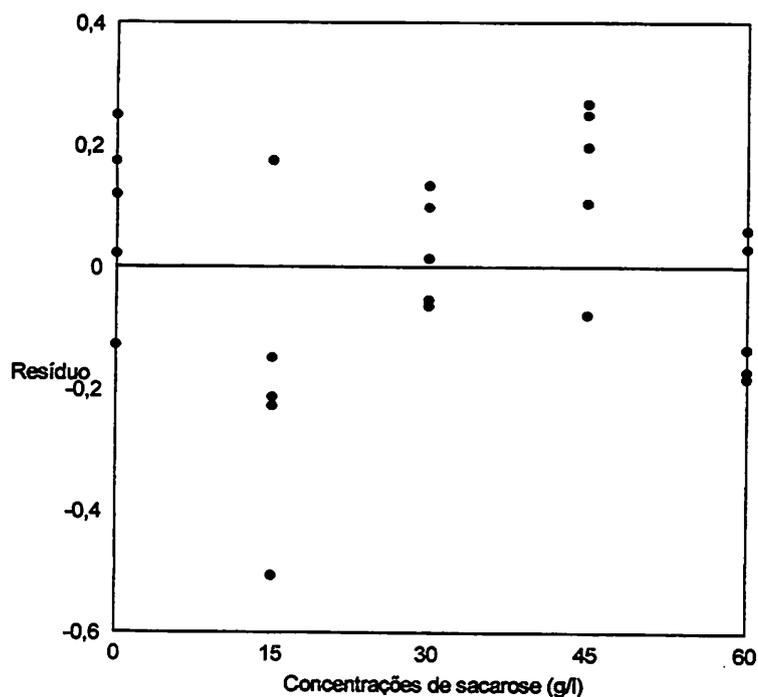


FIGURA 4. Análise de resíduos para número de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de sacarose, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

$$Y = 1,486705 - 0,25989X_2 + 0,612712\sqrt{X_2} - 0,00408X_1 + 0,080972\sqrt{X_1}$$

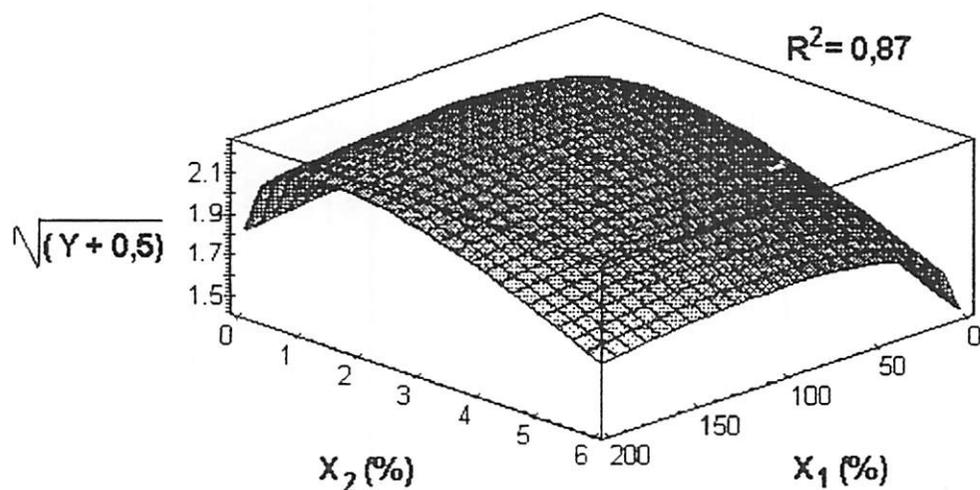


FIGURA 5. Superfície de resposta para número de brotações da cultivar 'Matua' ( $\sqrt{(Y+0,5)}$ ), em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

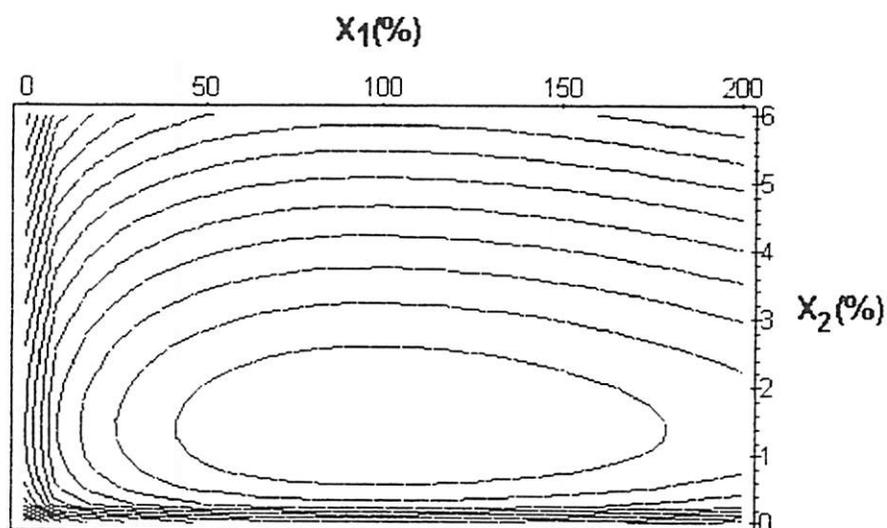


FIGURA 6. Diagrama de contornos para número de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

constataram que nesta concentração, o número e a capacidade de sobrevivência das brotações foram fortemente limitados. No entanto, a alta taxa de multiplicação verificada nessa concentração pode ser atribuída à diminuição do potencial osmótico do meio, o qual aumentou a disponibilidade de água e conseqüentemente de citocinina (BAP), e também podendo estar associada às reservas existentes nas microestacas.

#### 4.1.2 Comprimento de brotações

Em geral, as concentrações mais altas de nutrientes do meio MS favoreceram a obtenção de brotações maiores da cultivar 'Hayward', principalmente quando a estas foram adicionadas concentrações intermediárias de sacarose. O aumento do crescimento verificado nas combinações feitas com o nível zero de ambos fatores pode estar relacionado com a dificuldade de padronização do material vegetal *in vitro*. Portanto, as microestacas utilizadas nesses tratamentos podem ter superestimado o comprimento. As brotações mais compridas da cultivar 'Hayward' seriam obtidas, de acordo com a superfície ajustada (Fig. 7), na associação de 200% de meio MS com 36,30 g/l de sacarose, sendo o comprimento de aproximadamente, 12,10 mm. Esta tendência também pode ser constatada pelo diagrama de contornos (Fig. 8). As análises de resíduos são ilustradas nas Figuras 9 e 10. Novamente, a natureza da distribuição dos resíduos não foi tal que invalidasse o modelo.

Na ausência de nutrientes, o comprimento de brotações da cultivar 'Matua' apresentou-se constante e bastante inferior em relação ao de brotações obtidas em meios enriquecidos com soluções nutritivas. A elevação da concentração de nutrientes proporcionou, de maneira geral, aumento crescente do tamanho dessas brotações, sendo este mais intensificado à medida que concentrações intermediárias de sacarose foram combinadas. As brotações de maior tamanho (10,80 mm, em média) dessa cultivar, poderiam ser encontradas, de acordo com o modelo ajustado (Fig. 11) e conforme também se observa no diagrama de contornos (Fig. 12), se fossem adicionados 35,20 g/l de sacarose a um meio contendo 163,51% da concentração de nutrientes.

$$Y = 0,850004 + 0,023242X_2 - 0,002196X_1 - 0,000002039X_1^2 - 0,000002784(X_1^2 \times X_2) + 0,003542(X_1 \times X_2) - 0,000306(X_1 \times X_2^2) + 0,042615\sqrt{X_1} - 0,047407\sqrt{(X_2 \times X_1)}$$

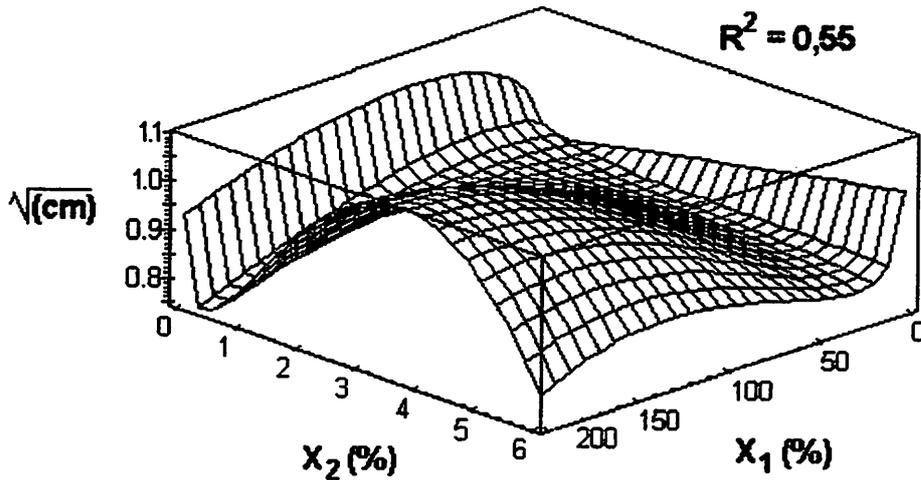


FIGURA 7. Superfície de resposta para comprimento de brotações da cultivar 'Hayward' ( $\sqrt{\text{cm}}$ ), em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

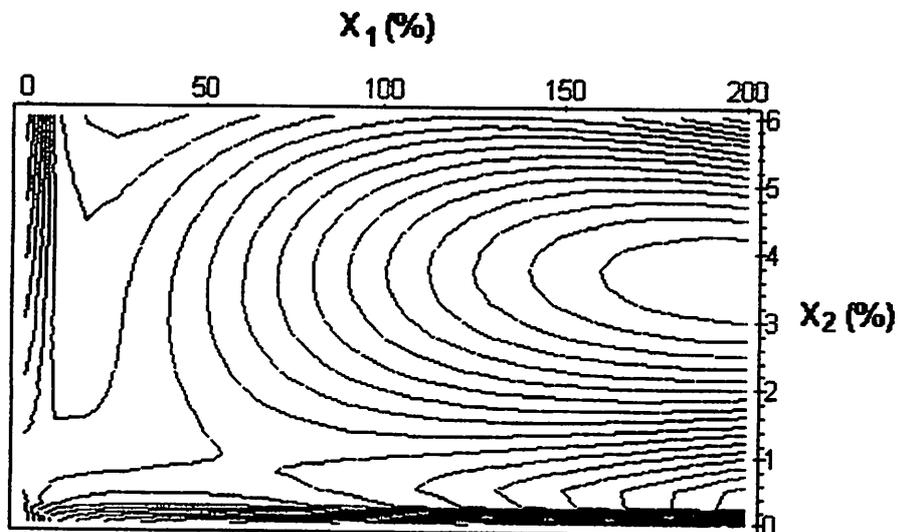


FIGURA 8. Diagrama de contornos para comprimento de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

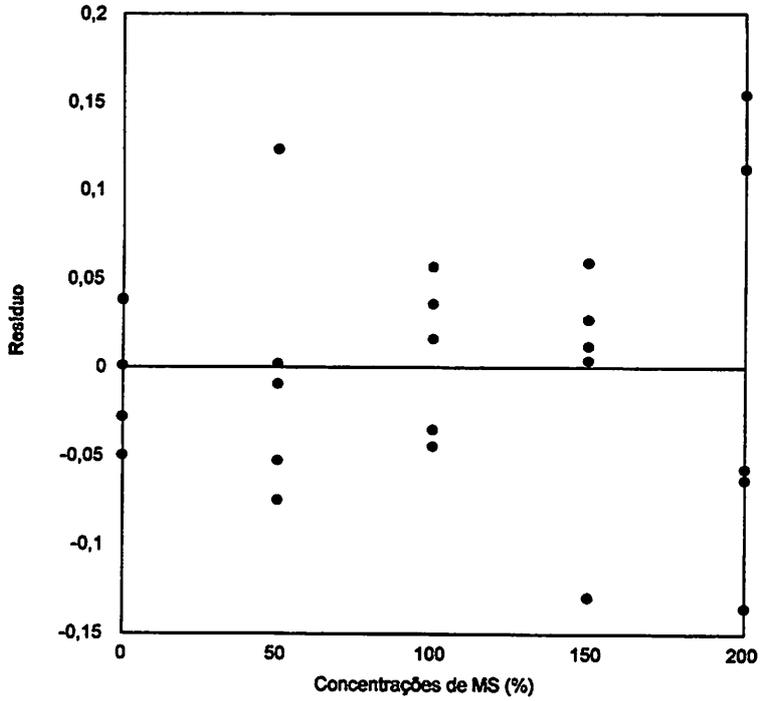


FIGURA 9. Análise de resíduos para comprimento de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração do meio MS, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

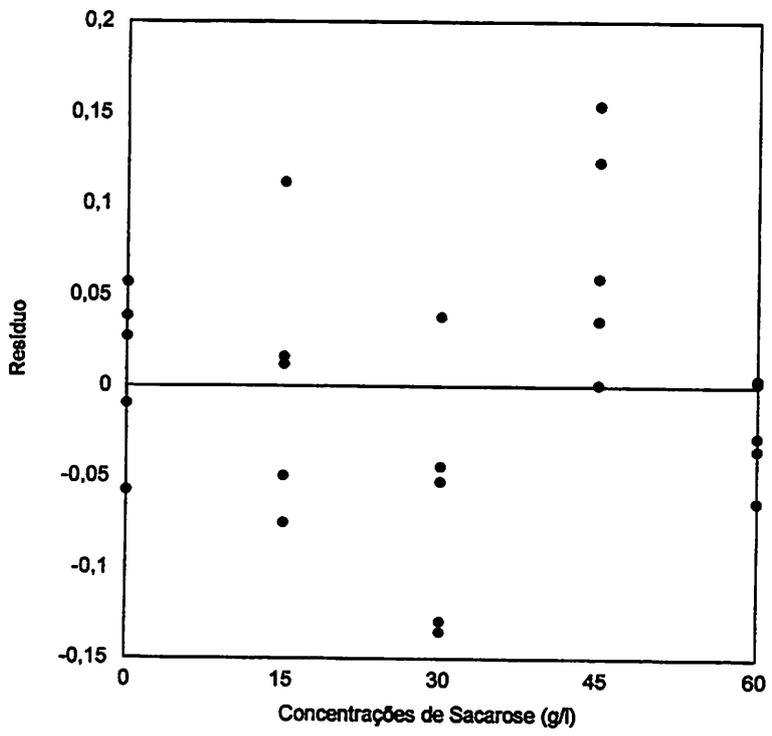


FIGURA 10. Análise de resíduos para comprimento de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de sacarose, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

$$Y = 0,245014 + 0,004509X_1 - 0,000015818X_1^2 + 0,002508(X_1 \times X_2) - 0,000255(X_1 \times X_2^2) - 0,000004346(X_1^2 \times X_2)$$

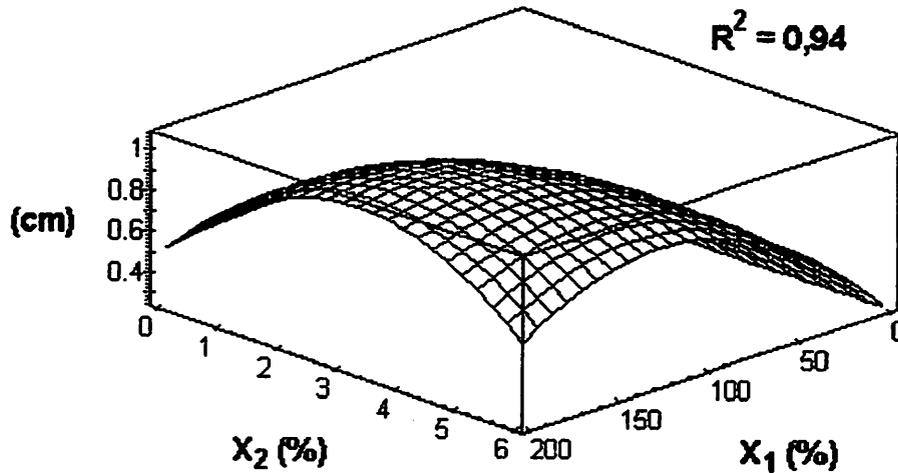


FIGURA 11. Superfície de resposta para comprimento de brotações da cultivar 'Matua' (cm), em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

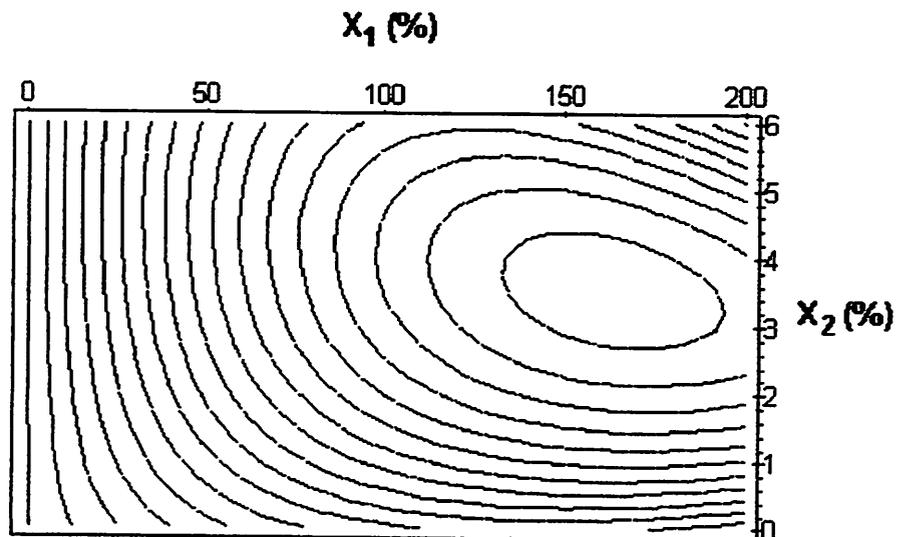


FIGURA 12. Diagrama de contornos para comprimento de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

#### 4.1.3 Peso da matéria seca da parte aérea de brotações

Os tratamentos desprovidos de sacarose, assim como os deficientes em nutrientes, apresentaram redução no PMSPA de brotações da cultivar 'Hayward'. Os melhores resultados foram verificados quando aumentou-se a concentração do meio MS e, principalmente quando concentrações mais elevadas de sacarose foram adicionadas. O valor do peso da matéria da parte aérea de brotações, após secagem em estufa, poderia ser considerado ótimo (71,60 mg/explante), de acordo com o modelo de superfície de resposta ajustado, na combinação de 134,96% de MS com 48,70 g/l de sacarose (Figuras 13 e 14). Uma vez que os desvios de regressão foram significativos para esta característica nesta cultivar, foram feitas análises de resíduos (Figuras 15 e 16). Quando esta foi feita em função da concentração de MS, observa-se na Figura 15 uma certa tendência quadrática com concavidade negativa. Entretanto, o modelo de superfície contém um parâmetro associado ao quadrado da concentração de MS. Com relação à análise de resíduos em função dos níveis de sacarose (Figura 16), não se observou tendência marcante na distribuição dos resíduos, indicando que, pelo menos com relação a este fator, o modelo é bastante satisfatório.

Aumentos quanto ao PMSPA de brotações da cultivar 'Matua', em tratamentos contendo sacarose, foram observados ao se elevar a concentração de MS. Da mesma forma, o aumento da concentração de sacarose também demonstrou aumentar o PMSPA, exceto em meios contendo concentrações bastante reduzidas de nutrientes. Logo, as melhores respostas foram mais evidentes em meios contendo concentrações mais elevadas tanto de nutrientes como de sacarose (Figura 17). De acordo com o modelo de superfície ajustado, o PMSPA de brotações da cultivar 'Matua' poderia ser maximizado (42,30 mg/explante) em meio contendo 134,63% da concentração de nutrientes do MS e 51,60 g/l de sacarose. Coerentemente com a significância da interação entre os fatores para esta característica (Tabela 2), pode-se observar no diagrama de contornos (Figura 18) uma relação de dependência entre os fatores, evidenciada pela tendência dos eixos dos elipsóides manterem-se não-paralelos aos eixos das variáveis independentes.

$$Y = 0,027342 + 0,059687X_2 + 0,000838X_1 - 0,008421X_2^2 - 0,00000397X_1^2 + 0,000282(X_1 \times X_2) - 0,000000867(X_1^2 \times X_2)$$

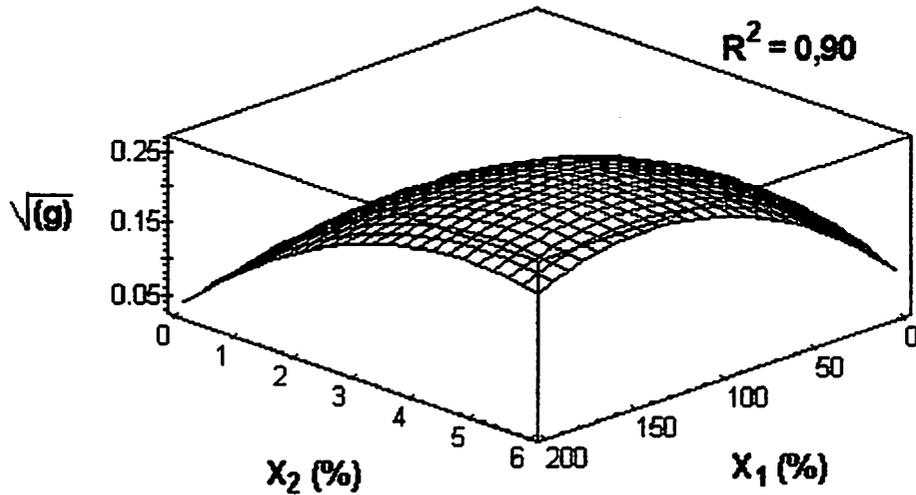


FIGURA 13. Superfície de resposta para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Hayward' ( $\sqrt{(g)}$ ), em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

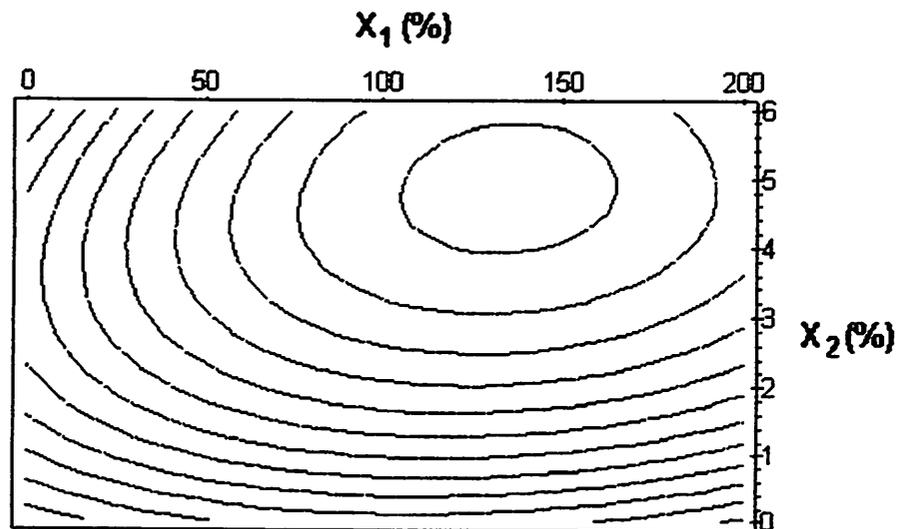


FIGURA 14. Diagrama de contornos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

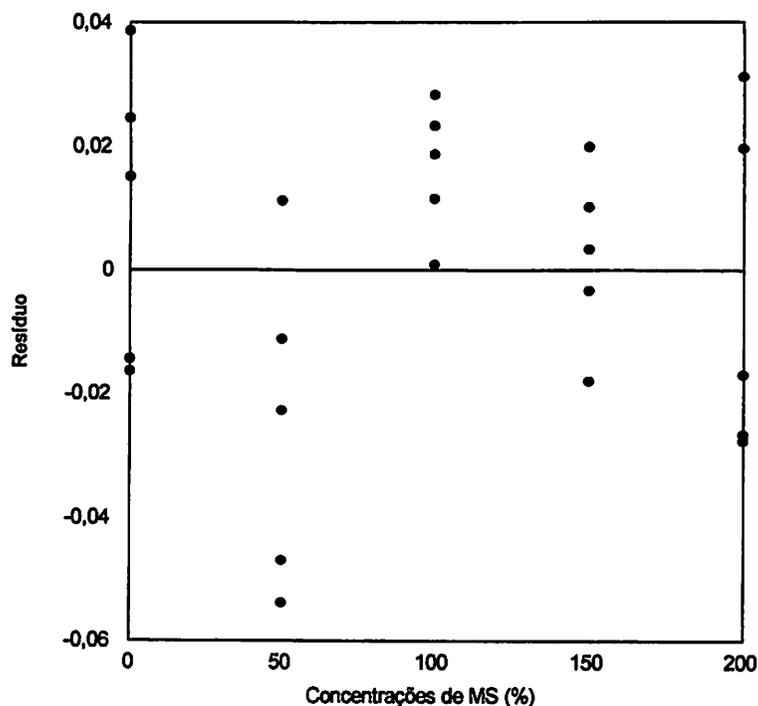


FIGURA 15. Análise de resíduos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração do meio MS, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

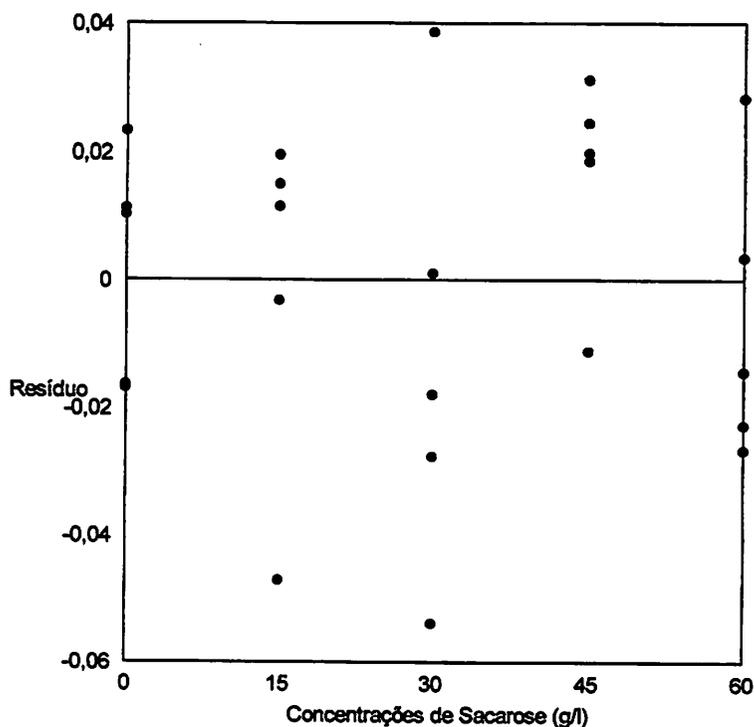


FIGURA 16. Análise de resíduos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de sacarose, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

$$Y = 0,041892 + 0,028939\sqrt{X_2} - 0,000469X_1 + 0,006928\sqrt{X_1} + 0,000363(X_1 \times X_2) - 0,00003173(X_1 \times X_2^2) - 0,000000617(X_1^2 \times X_2)$$

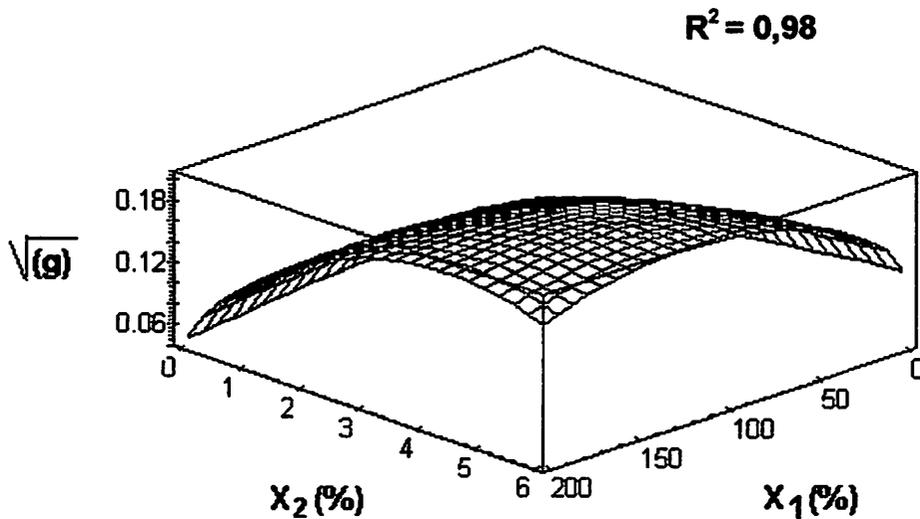


FIGURA 17. Superfície de resposta para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Matua' ( $\sqrt{(g)}$ ), em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e de sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

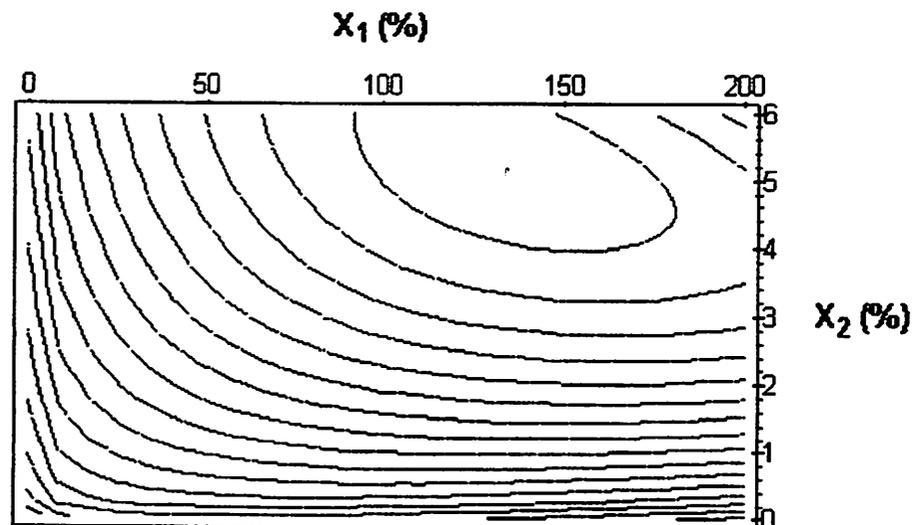


FIGURA 18. Diagrama de contornos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração do meio MS ( $X_1$ ) e sacarose ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

Não houve formação de calo e tampouco de raiz na ausência de nutrientes e/ou de sacarose. No entanto, observou-se alta incidência de calo (verde e friável) nos demais tratamentos, exceto quando a sacarose a 15 g/l foi combinada com 200% da concentração das soluções nutritivas. Neste caso, a frequência de calo foi extremamente reduzida nas duas cultivares. No processo de micropropagação, a formação de calo é totalmente indesejável, uma vez que este é o principal sítio de acumulação de macro e microelementos no final do período de cultivo (Mezzetti, Rosati e Casalicchio, 1991); concorrendo com a formação de partes aéreas normais, por representar forte dreno na absorção desses elementos minerais.

Verificou-se esporadicamente pequena quantidade de raízes nos explantes das cultivares, praticamente em quase todos os tratamentos contendo 50% da concentração de MS, e também, quando o meio na sua concentração total (100%) foi adicionado de 30 g/l ou mais de sacarose. Ainda na cultivar 'Matua', as raízes também bastante raras, foram encontradas quando combinou-se 150% da concentração de nutrientes com 45 g/l de sacarose. Isto mostra que a sacarose é essencial para o enraizamento *in vitro* de kiwi e que, tanto a carência como o excesso de nutrientes do meio de cultura podem afetar negativamente, o surgimento de raízes em microestacas de kiwi.

#### **4.2 Ensaio 3 e 4: Influência da concentração de ágar e do nível de pH na multiplicação *in vitro* das cultivares 'Hayward' e 'Matua'**

Neste tipo de ensaio pôde-se observar que o nível de pH ajustado pode influenciar na solidificação de meios. Portanto, a consistência do meio não depende somente da concentração de ágar, mas também, do nível de pH ajustado, conforme relatado por Murashige (1974), Pierik (1987), George (1993) e Peixoto e Pasqual (1995).

Em meio líquido, independente do nível de pH ajustado, os explantes tanto da cultivar 'Hayward' como da 'Matua', apresentaram-se completamente vítreos, com folhas bastante translúcidas, podendo estas possuírem ou não pêlos. Apesar de vitrificados, os explantes desenvolveram-se, ou seja, suas gemas foram capazes de

emitir brotações. Resultados semelhantes foram encontrados para macieira e pereira (Singha, 1984 e Singha, Oberly e Townsend, 1987), kiwi (cv. 'Hayward') (Monette, 1986), roseira (Ghashghaie, Brenckmann e Saugier, 1991) e videira (Peixoto e Pasqual, 1995).

Os piores resultados relacionados ao desenvolvimento foram visualizados quando fez-se a combinação dos níveis 3,7 a 5,7 com 0,2% de ágar ou, quando o pH 3,7 foi combinado com 0,4% de agente solidificante. Nesses tratamentos, os explantes permaneceram totalmente mergulhados no meio. O baixo vigor observado, mais acentuado na cultivar 'Hayward', pode ser explicado pela falta de sustentação dos explantes, que, devido à condição de total anoxia, apresentaram-se cloróticos e vitrificados, impedindo, conseqüentemente, o crescimento e o desenvolvimento normal dos mesmos. As folhas, quando presentes, principalmente na cultivar 'Hayward', eram muito delgadas e enroladas (encurvadas). Em alguns casos, foi evidenciado um engrossamento das hastes, as quais tornaram-se encarquilhadas e frágeis.

Embora o desenvolvimento nos tratamentos correspondentes aos níveis 6,7 e 7,7, combinados com 0,2% de ágar, aparentou ser melhor do que quando comparado com os níveis de pH mais baixos, os explantes ainda continuaram parcialmente submersos. Estes meios também resultaram em brotações com hastes grossas e retorcidas e ainda com folhas quebradiças, de dimensões desproporcionais (principalmente na cultivar 'Hayward'), sendo estes considerados sintomas típicos de vitrificação. Em algumas plântulas das cultivares estudadas, foi observada também a presença de clorose.

À medida que elevou-se o nível de pH ajustado em meios solidificados com 0,4% de ágar, observou-se melhora no vigor das plântulas. Embora aumentando o nível de pH, a maioria das plântulas da cultivar 'Hayward' ficaram parcialmente submersas, apresentando ainda sintomas de clorose e vitrificação. As bases de explantes de macieira e pereira (Singha, 1982) e crisântemo (Oliveira, 1994) também permaneceram mergulhadas quando estes foram cultivados em meios semi-sólidos. Segundo Singha (1982), isto promove bom contato entre ambos, aumentando a disponibilidade de nutrientes e reguladores de crescimento, assim como facilitando a absorção destes pelas brotações (Pierik, 1987).

Mesmo utilizando o ágar na concentração de 0,6%, o meio ainda assim apresentou-se semi-sólido e bastante aderido ao material vegetal, quando o pH foi ajustado para níveis mais baixos (3,7 ou até mesmo 4,7), o que está de acordo com Caldas, Haridasan e Ferreira (1990) e George (1993), os quais relataram a dificuldade de polimerização do ágar em baixos níveis de pH, após o processo de autoclavagem. À medida que elevou-se o nível de pH em meios solidificados com esta concentração de ágar, estes tornaram-se mais consistentes. Isto serve para comprovar mais uma vez que a consistência do meio também varia em função do nível de pH ajustado (Murashige, 1974 e Pierik, 1987).

De modo geral, em meios sólidos (0,6 a 1,0% de ágar) constatou-se o desenvolvimento de plântulas normais, cobertas por densa pilosidade, apresentando bom enfolhamento, com coloração tendendo a verde escuro. Ainda verificou-se nas duas cultivares que o aumento da concentração de ágar também favoreceu a redução da percentagem de brotações vitrificadas, como observado por Debergh (1983); Pasqualetto, Zimmerman e Fordham (1986); Pasqualetto Zimmerman e Fordham (1988); Ghashghaie, Brenckmann e Saugier (1991) e Peixoto e Pasqual (1995).

A interação entre os níveis de pH e concentrações de ágar influenciou significativamente todas as variáveis avaliadas na propagação *in vitro* das cultivares 'Hayward' (Tabela 3) e 'Matua' (Tabela 4). Nos dois ensaios, os modelos de regressão ajustados apresentaram desvio altamente significativo, exceto para o comprimento de brotações da cultivar 'Matua' (Tabela 4).

TABELA 3. Resumo das análises de variância para número de brotações (NB), comprimento de brotações (CB) e peso da matéria seca da parte aérea (PMSPA) de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de ágar e do nível de pH, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

Causas da variação	G.L.	NB <sup>1/</sup>		CB <sup>1/</sup>		PMSPA <sup>1/</sup>	
		Q.M.	G.L.	Q.M.	G.L.	Q.M.	
pH	4	0,1805745 **	4	0,0233963 *	4	0,0097404 **	
Ágar	5	0,6261181 **	5	0,1718863 **	5	0,0480058 **	
pH x Ágar	20	0,1396124 **	20	0,0356521 **	20	0,0147729 **	
Tratamentos	29	0,2291427 **	29	0,0574503 **	29	0,0198086 **	
Regressão	8	0,4825950 **	8	0,1391850 **	7	0,0466800 **	
Desvio	21	0,1325894 **	21	0,0263133 **	22	0,0112586 **	
Resíduo	90	0,0298014	90	0,0086501	90	0,0015850	
C.V.(%)		9,997		8,793		16,329	

<sup>1/</sup> Observações transformadas segundo  $\sqrt{(X)}$ .

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 4. Resumo das análises de variância para número de brotações (NB), comprimento de brotações (CB) e peso da matéria seca da parte aérea (PMSPA) de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração de ágar e do nível de pH, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

Causas da variação	G.L.	NB <sup>1/</sup>		G.L.	CB		G.L.	PMSPA <sup>2/</sup>	
		Q.M.			Q.M.			Q.M.	
pH	4	0,3961687 **		4	0,2953990 **		4	0,0152651 **	
Ágar	5	0,4161177 **		5	0,2915510 **		5	0,0381975 **	
pH x Ágar	20	0,1523823 **		20	0,0602512 *		20	0,0045518 **	
Tratamentos	29	0,2314796 **		29	0,1325647 **		29	0,0118305 **	
Regressão	6	0,6518666 **		5	0,5361040 **		4	0,0570700 **	
Desvio	23	0,1218135 **		24	0,0484940 <sup>ns</sup>		25	0,0045922 **	
Resíduo	90	0,0509446		90	0,0297547		90	0,0011300	
C.V.(%)		10,234			16,705			16,996	

<sup>1/</sup> Observações transformadas segundo  $\sqrt{(X + 0,5)}$ .

<sup>2/</sup> Observações transformadas segundo  $\sqrt{(X)}$ .

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>ns</sup> Não significativo

#### 4.2.1 Número de brotações

O aumento do número de brotações da cultivar 'Hayward' foi observado quando ajustou-se o pH para níveis mais elevados em meios contendo concentração de ágar moderada tendendo a alta. No entanto, em concentrações mais altas de ágar (meio extremamente sólido), este aumento foi verificado quando efetuou-se o ajuste do

pH para níveis intermediários ou mais baixos. As menores concentrações de ágar, assim como também o meio líquido limitaram a multiplicação, independente do nível de pH ajustado. Todavia, a mais alta taxa de proliferação de brotações pôde ser verificada em meios contendo elevada concentração de ágar e com pH ajustado para níveis intermediários. O modelo de regressão ajustado apresentou desvio altamente significativo (Tabela 3). Apesar disso, as análises de resíduos (Figuras 21 e 22) não evidenciam nenhuma tendência marcante, o que não invalida o modelo de regressão ajustado. De acordo com este modelo, o número máximo de brotações da cultivar 'Hayward' seria produzido em meio com pH ajustado para 5,85 e sendo o mesmo solidificado com 0,82% de ágar, correspondendo a 3,88 brotações por explante (Fig. 19). Este comportamento também pode ser visualizado pelo diagrama de contornos (Fig. 20).

No caso dessa cultivar, observou-se que o aumento da concentração de ágar não foi prejudicial à proliferação de brotações, como verificado por Singha (1982); Monette (1986); Pasqualetto, Zimmerman e Fordham (1986); Pasqualetto Zimmerman e Fordham (1988); Ghashghaie, Brenckmann e Saugier (1991) e Peixoto e Pasqual (1995). Segundo Pierik (1987), os meios mais consistentes, além de dificultar a inoculação, diminuem a absorção de nutrientes.

De modo geral, para a cultivar 'Matua', os níveis de pH mais baixos, ao contrário dos mais elevados, propiciaram aumento do número de brotações, independentemente da concentração de ágar associada, como pode ser observado pela superfície de resposta ajustada (Fig. 23). Este aumento foi também verificado, quando concentrações intermediárias de ágar foram combinadas com todos os níveis de pH. De acordo com o modelo de regressão múltipla que gerou a superfície, o máximo quanto ao número de brotações da cultivar 'Matua', foi estimado como sendo a combinação entre o nível de pH 3,70 e 0,62% de ágar, correspondendo à produção de 5,96 brotações. Esse ponto é igualmente observado no diagrama de contornos (Fig. 24). As Figuras 25 e 26 apresentam as análises dos resíduos, visto que o desvio de regressão para este modelo também foi altamente significativo (Tabela 4). Também aqui não parece haver razões para invalidar o modelo.

$$Y = 0,853044 + 0,177172X_2 - 0,001299X_2^3 + 1,843886X_1^2 - 0,760422X_1^3 - 1,312978\sqrt{X_1} - 0,309244(X_1^2 \times X_2) + 0,106972\sqrt{(X_1 \times X_2)} + 0,852272\sqrt{(X_1^2 \times X_2)}$$

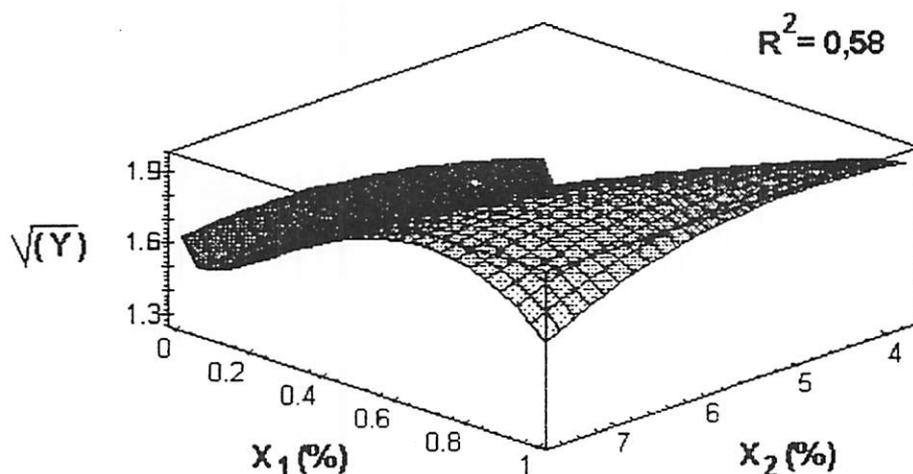


FIGURA 19. Superfície de resposta para número de brotações da cultivar 'Hayward' ( $\sqrt{Y}$ ), em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

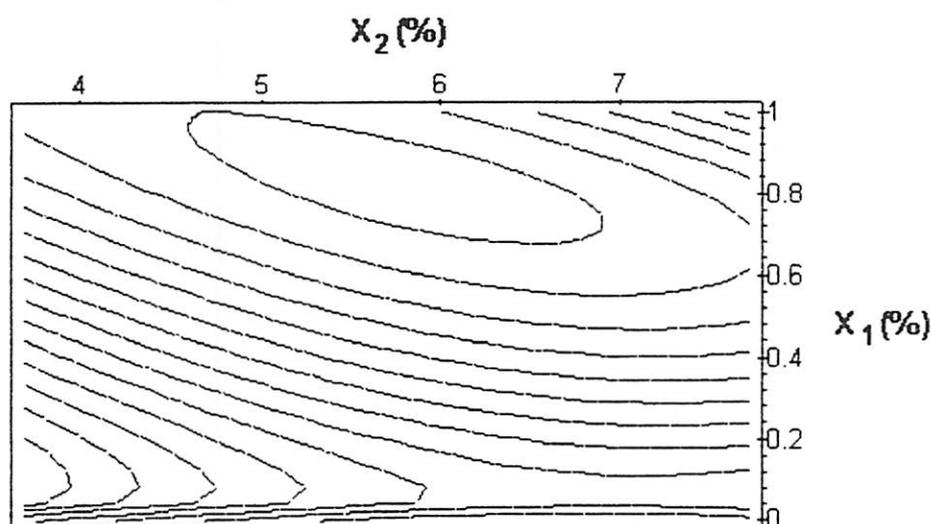


FIGURA 20. Diagrama de contornos para número de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

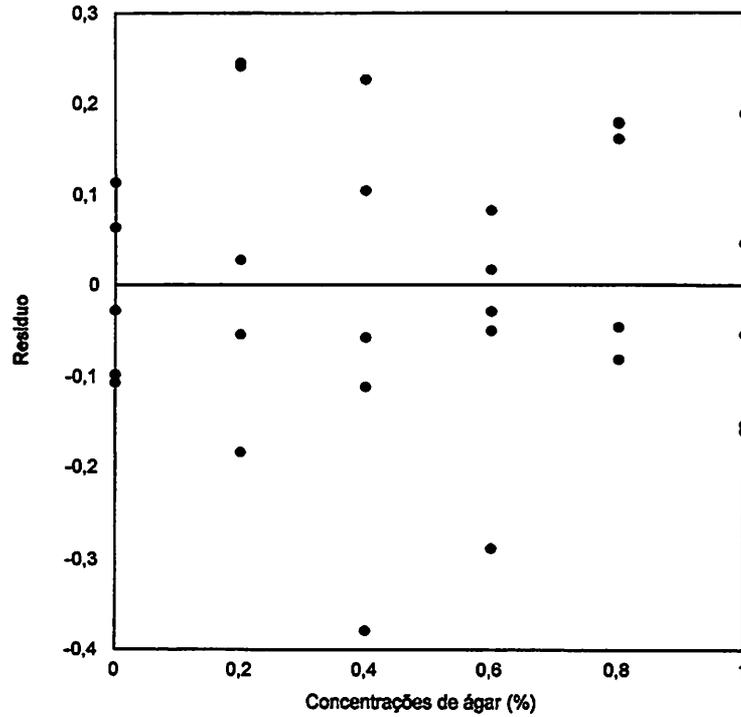


FIGURA 21. Análise de resíduos para número de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de ágar, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

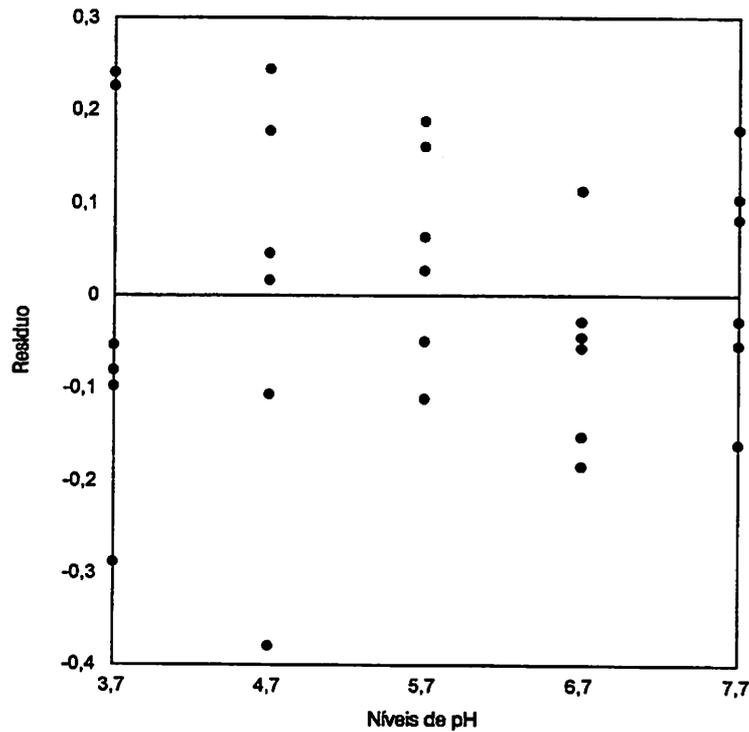


FIGURA 22. Análise de resíduos para número de brotações da cultivar 'Hayward', em função do nível de pH, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

$$Y = -11,704717 + 1,983349X_1 + 2,54941X_2 - 1,267009X_1^2 - 0,153267X_2^2 + 23,793073X_2^{-1} - 0,113731(X_1 \times X_2)$$

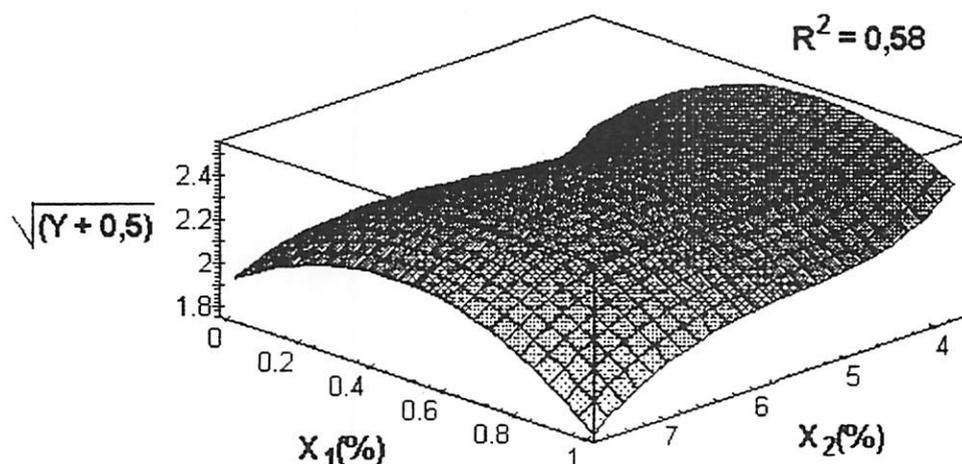


FIGURA 23. Superfície de resposta para número de brotações da cultivar 'Matua' ( $\sqrt{(Y+0,5)}$ ), em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

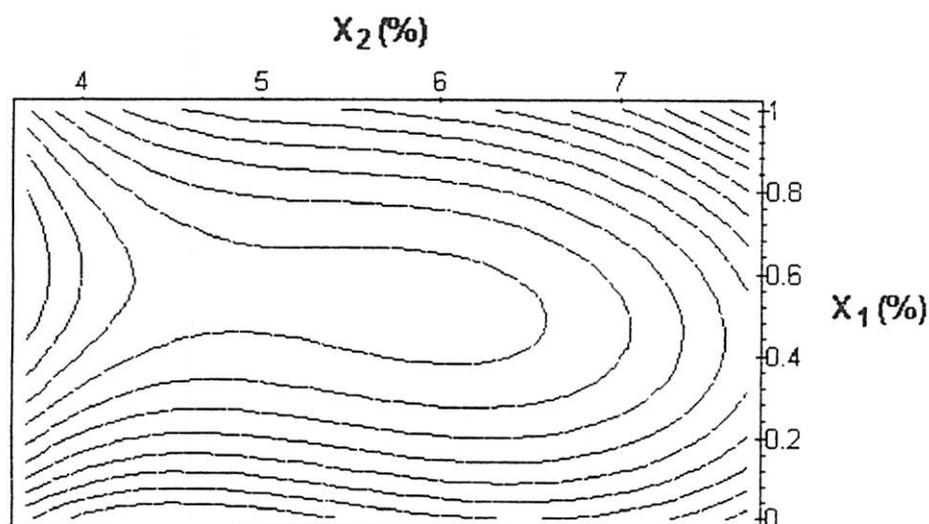


FIGURA 24. Diagrama de contornos para número de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

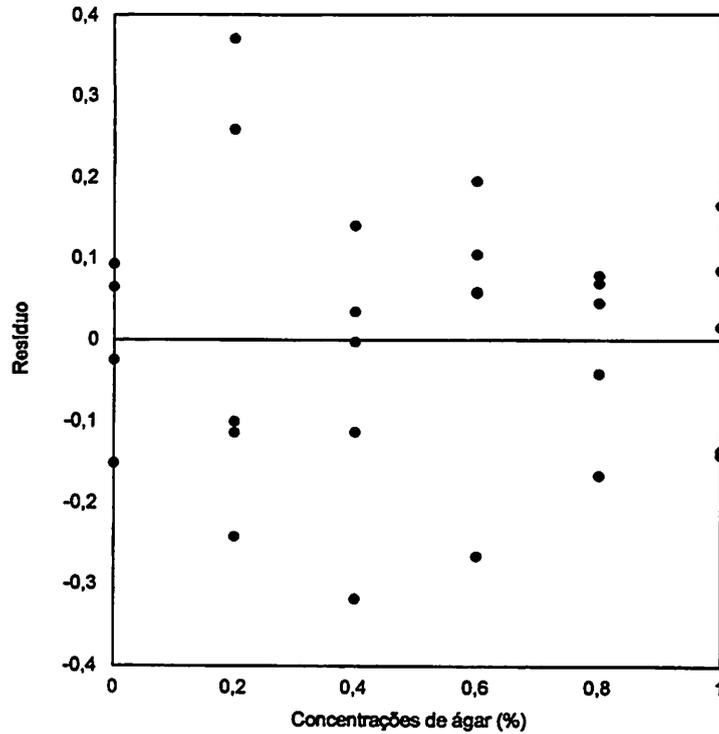


FIGURA 25. Análise de resíduos para número de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração de ágar, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

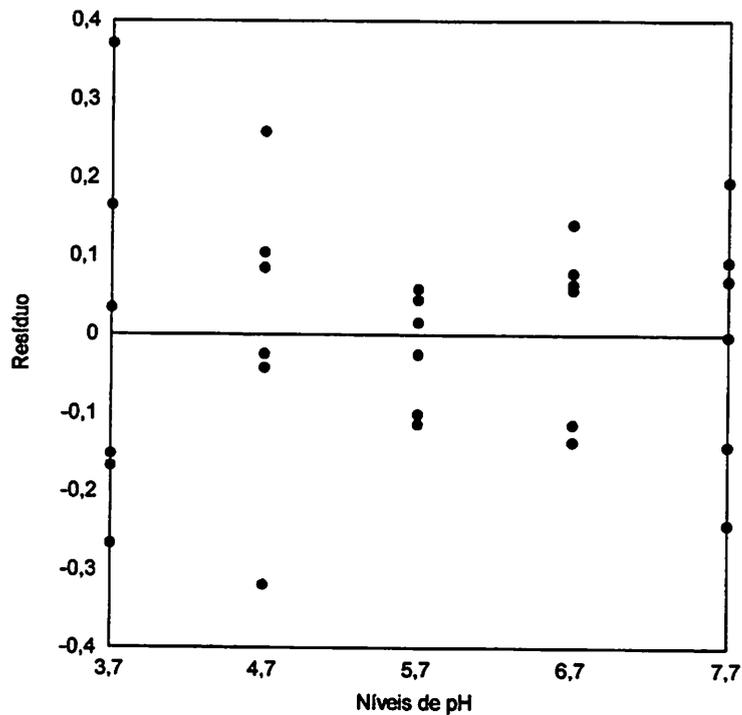


FIGURA 26. Análise de resíduos para número de brotações da cultivar 'Matua', em função do nível de pH, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

#### 4.2.2 Comprimento de brotações

Os meios com concentrações reduzidas de ágar, incluindo também os líquidos, permitiram a obtenção de brotações mais compridas, para a cultivar 'Hayward', quando o pH destes foi aferido para níveis mais altos. Todavia, em concentrações intermediárias e mais elevadas de ágar, as brotações apresentaram maior tamanho, quando estas foram combinadas com pH ajustado para níveis mais baixos. As maiores brotações da cultivar 'Hayward' poderiam ser obtidas em meio solidificado com 0,45% de ágar e com pH ajustado para 4,70, de acordo com o modelo de superfície de resposta, correspondendo a um comprimento de 14,21 mm (Figuras 27 e 28). As análises de resíduos para comprimento de brotações dessa cultivar são apresentadas nas Figuras 29 e 30. A exceção de um possível outlier (valor discrepante) observado na concentração 0,2% de ágar (Figura 29), a dispersão dos resíduos não parece invalidar o modelo.

Para a cultivar 'Matua', o pH dos meios, quando ajustado para níveis mais baixos, resultou em brotações mais compridas, porém este tamanho foi significativamente maior quando tais meios foram geleificados com concentrações intermediárias de ágar. As menores brotações foram verificadas tanto em meio líquido como nos meios extremamente alcalinos e também nos mais sólidos. O comprimento máximo (12,23 mm) de brotações da cultivar 'Matua', poderia ser obtido na combinação do pH 4,28 com ágar a 0,48%, conforme observado nas Figuras 31 e 32.

#### 4.2.3 Peso da matéria seca da parte aérea de brotações

Aumentos crescentes do PMSPA de brotações da cultivar 'Hayward' foram observados à proporção que elevou-se o pH, em meios solidificados com concentrações intermediárias e até mesmo, concentrações bastante reduzidas de ágar, incluindo os meios líquidos (Figuras 33 e 34). Entretanto, em meios solidificados com concentrações mais altas, o aumento do PMSPA foi favorecido quando efetuou-se o ajuste do pH para níveis mais inferiores. Todavia, as brotações da cultivar 'Hayward'

$$Y = 0,827954 + 7,151986X_1 + 0,01168X_2 - 6,612186X_1^2 + 2,262152X_1^3 - 0,757822(X_2 \times X_1) + 0,372807(X_1^2 \times X_2) - 4,34661\sqrt{X_1} + 1,641675\sqrt{(X_1 \times X_2)}$$

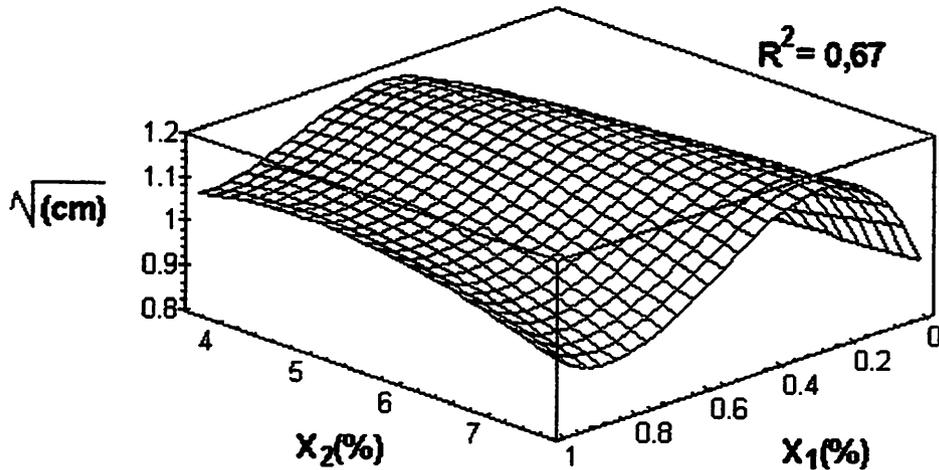


FIGURA 27. Superfície de resposta para comprimento de brotações da cultivar 'Hayward' ( $\sqrt{\text{cm}}$ ), em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

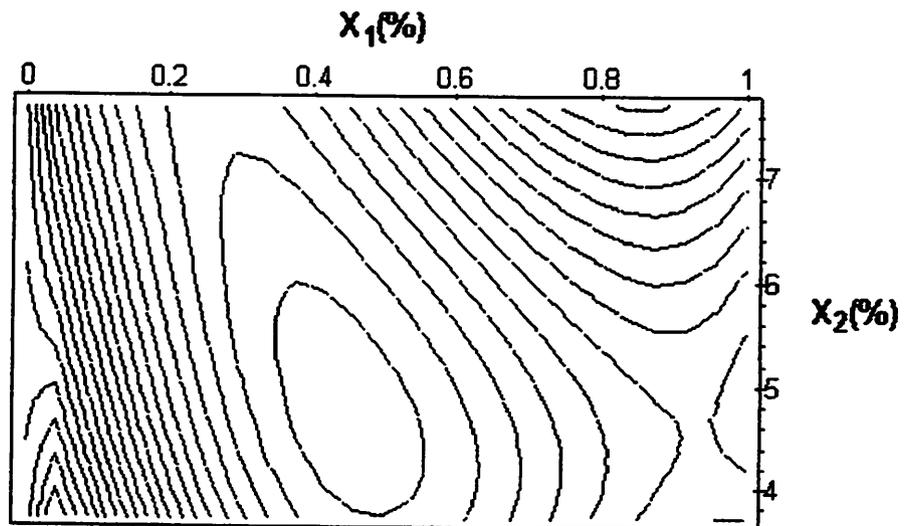


FIGURA 28. Diagrama de contornos para comprimento de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

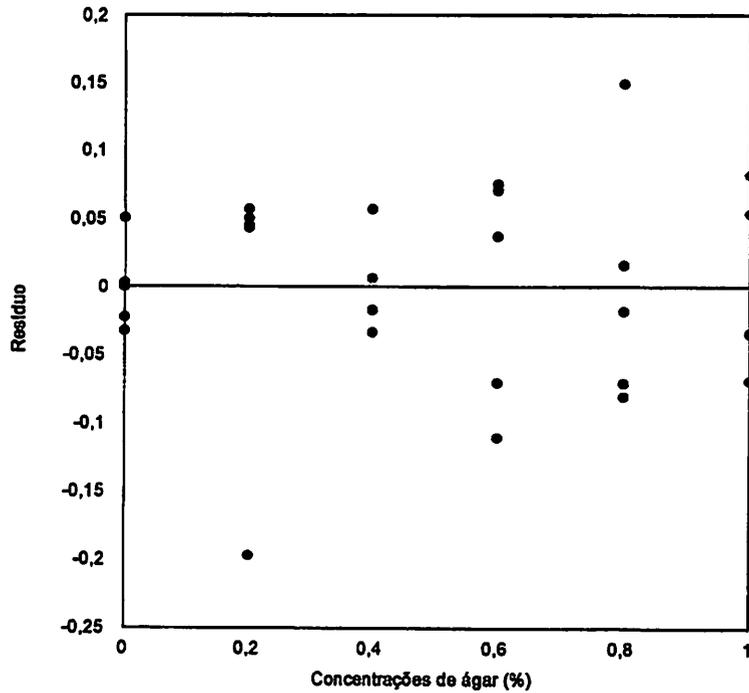


FIGURA 29. Análise de resíduos para comprimento de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de ágar, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

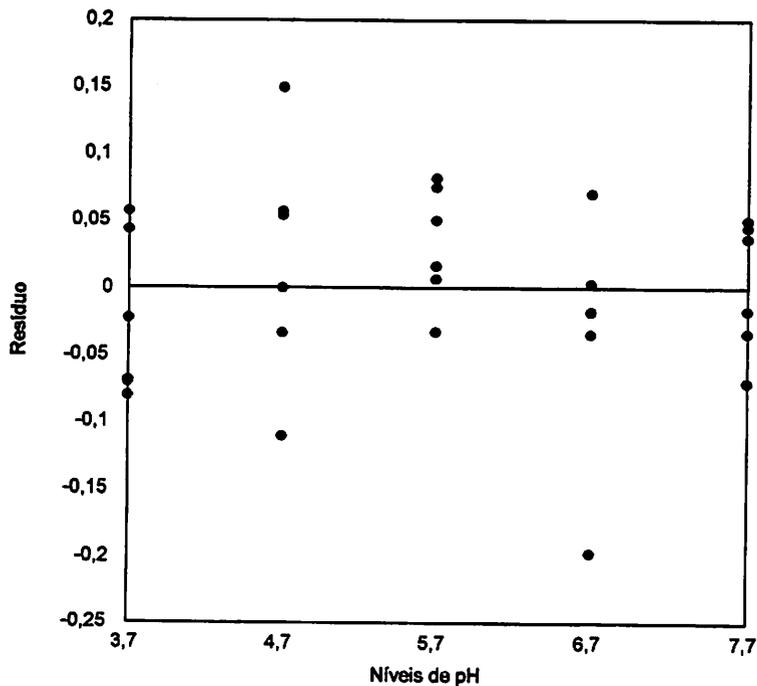


FIGURA 30. Análise de resíduos para comprimento de brotações da cultivar 'Hayward', em função do nível de pH, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

$$Y = 0,312317 - 0,269015X_1^2 + 0,821013\sqrt{X_1} + 0,226007X_2 - 0,022054X_2^2 - 0,077775(X_1 \times X_2)$$

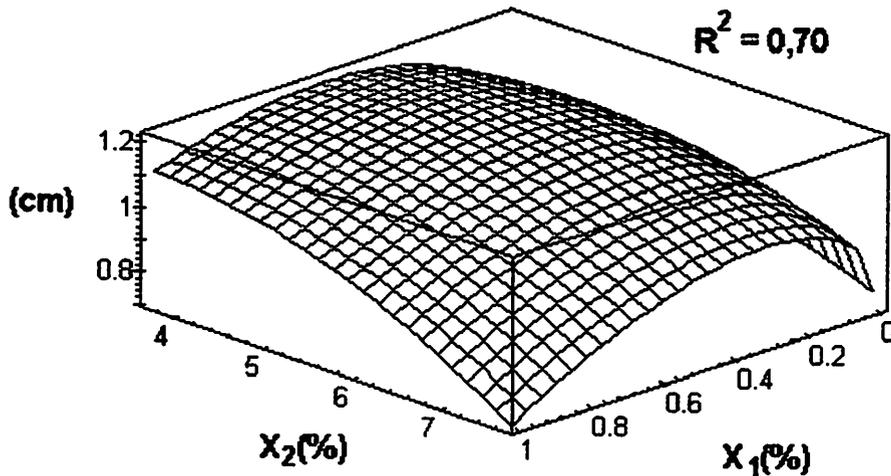


FIGURA 31. Superfície de resposta para comprimento de brotações da cultivar 'Matua' (cm), em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

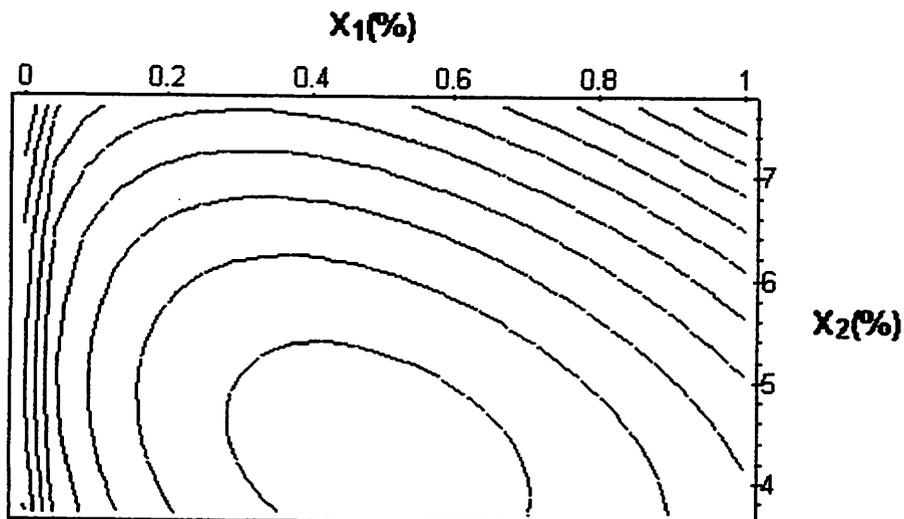


FIGURA 32. Diagrama de contornos para comprimento de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

$$Y = 0,153882 + 2,982286X_1 + 0,001706X_2 - 2,62221X_1^2 + 1,155066X_1^3 - 0,156502(X_1 \times X_2) - 1,97578\sqrt{X_1} + 0,597586\sqrt{(X_1 \times X_2)}$$

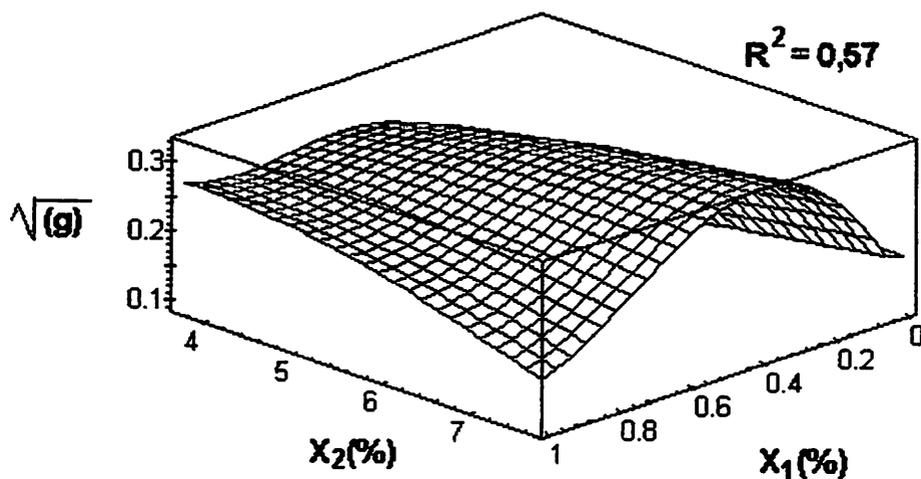


FIGURA 33. Superfície de resposta para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Hayward' ( $\sqrt{g}$ ), em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

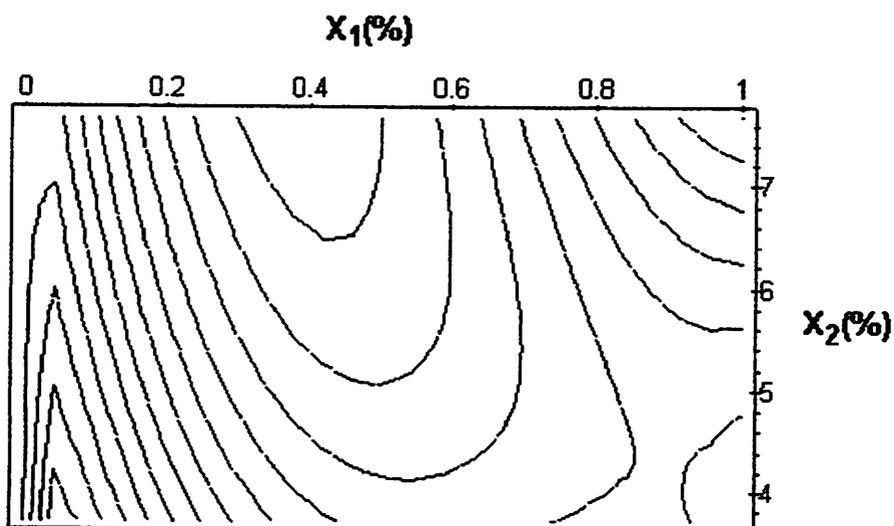


FIGURA 34. Diagrama de contornos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

apresentaram maior PMSPA quando níveis mais elevados de pH foram combinados com concentrações intermediárias de ágar (Figuras 33 e 34). Embora o modelo de superfície ajustado tenha apresentado um ponto de máximo (110 mg) correspondente aos níveis de 7,70 para pH e 0,39 % para ágar, a tendência predominante na superfície de resposta é a de uma "crista estacionária" (Box e Draper, 1987). De acordo com esses autores, em uma situação real nunca ocorrerão cristas perfeitas, e assim, se os pontos de máximo não forem muito marcantes, é mais significativo observar a conformação geral da superfície indicando melhores desempenhos nas concentrações intermediárias de ágar, em qualquer nível de pH. As Figuras 35 e 36 apresentam as análises de resíduos para PMSPA de brotações da cultivar 'Hayward'.

Estes resultados não foram compatíveis com os de Pierik (1987), o qual menciona que em níveis de pH acima de 7,0, o crescimento e desenvolvimento *in vitro* ficam prejudicados e também com os obtidos por Marino e Battistini (1990), os quais referem-se sobre a limitação da regeneração e sobrevivência de brotações de kiwi ('Hayward' e 'Tomuri') em níveis de pH superiores a 5,7.

Em meio líquido, o PMSPA de brotações da cultivar 'Matua' permaneceu constante e bastante reduzido para os diversos níveis de pH testados. Já em meios geleificados, os maiores PMSPAs foram alcançados quando o ajuste do pH foi feito para níveis mais inferiores. À medida que o ajuste foi efetuado para níveis mais superiores, o PMSPA decresceu gradativamente. De maneira geral, as melhores respostas quanto ao PMSPA de brotações dessa cultivar, foram obtidas quando combinaram-se concentrações intermediárias de ágar com níveis de pH mais inferiores. Portanto, através do modelo de regressão ajustado (Fig. 37) e também de acordo com o diagrama de contornos (Fig. 38), a produção máxima estimada (81,40 mg/explante) de matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Matua', seria obtida na associação entre o nível de pH 3,70 e 0,53% de ágar. As análises de resíduos para PMSPA de brotações dessa cultivar, podem ser visualizadas pelas Figuras 39 e 40. Parece ter havido uma tendência quadrática na dispersão de resíduos disposta ao longo das concentrações de ágar (Figura 39), mas também aqui houve o cuidado da inclusão de parâmetro relativo ao quadrado da concentração de ágar (Figura 37).

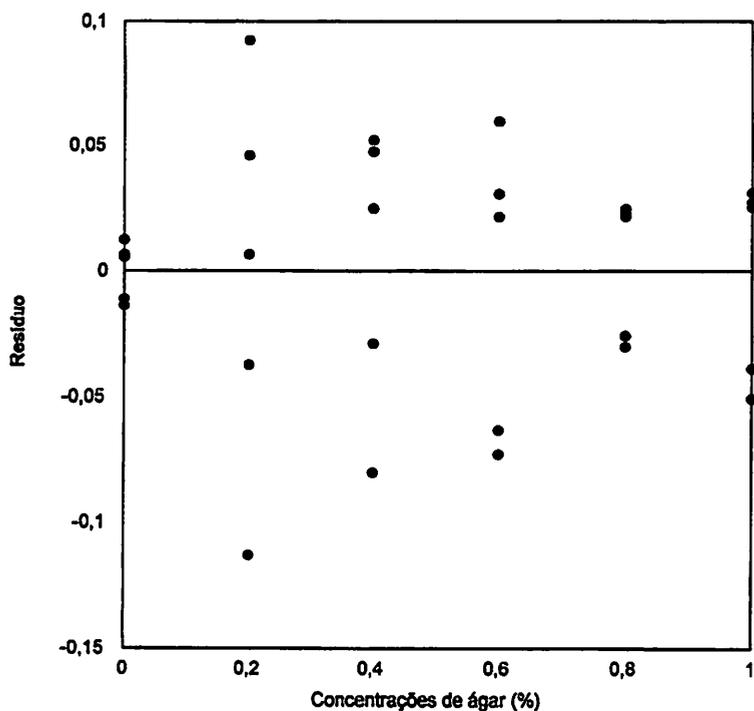


FIGURA 35. Análise de resíduos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Hayward', em função da concentração de ágar, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

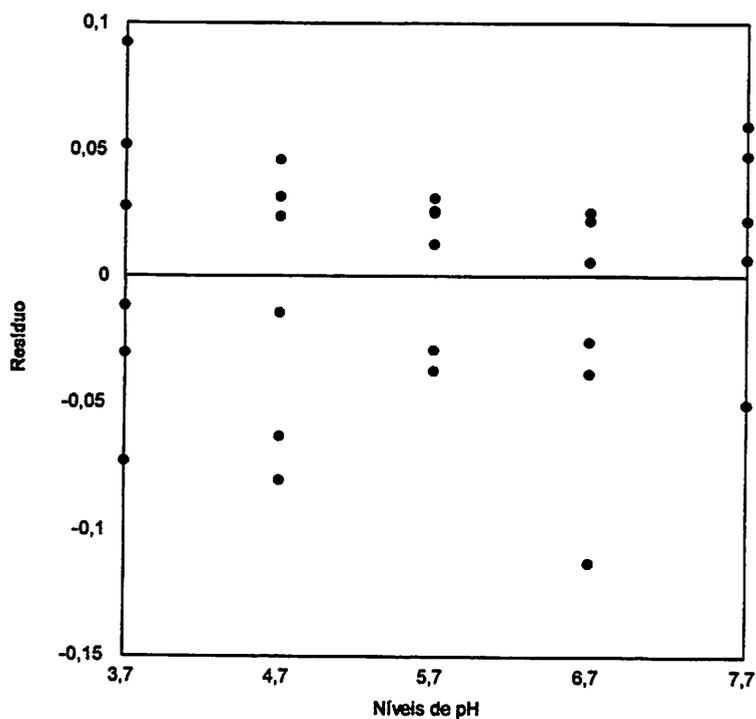


FIGURA 36. Análise de resíduos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Hayward', em função do nível de pH, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

$$Y = 0,155201 + 0,769905X_1 - 0,677859X_1^2 - 0,075187(X_1 \times X_2) + 0,057635(X_1^2 \times X_2)$$

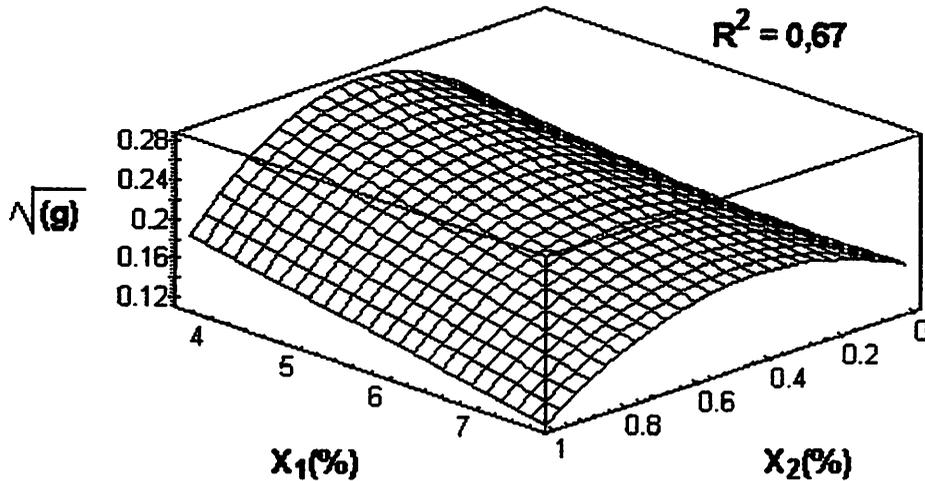


FIGURA 37. Superfície de resposta para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Matua' ( $\sqrt{g}$ ), em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

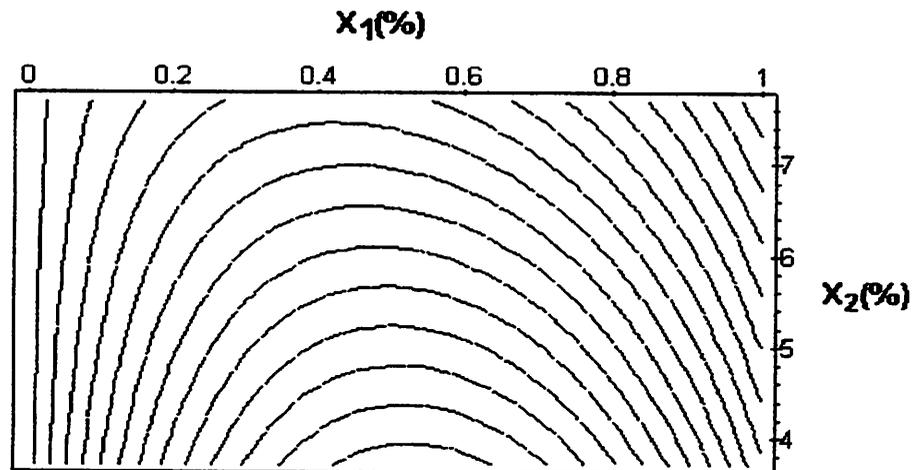


FIGURA 38. Diagrama de contornos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração de ágar ( $X_1$ ) e do nível de pH ( $X_2$ ), após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

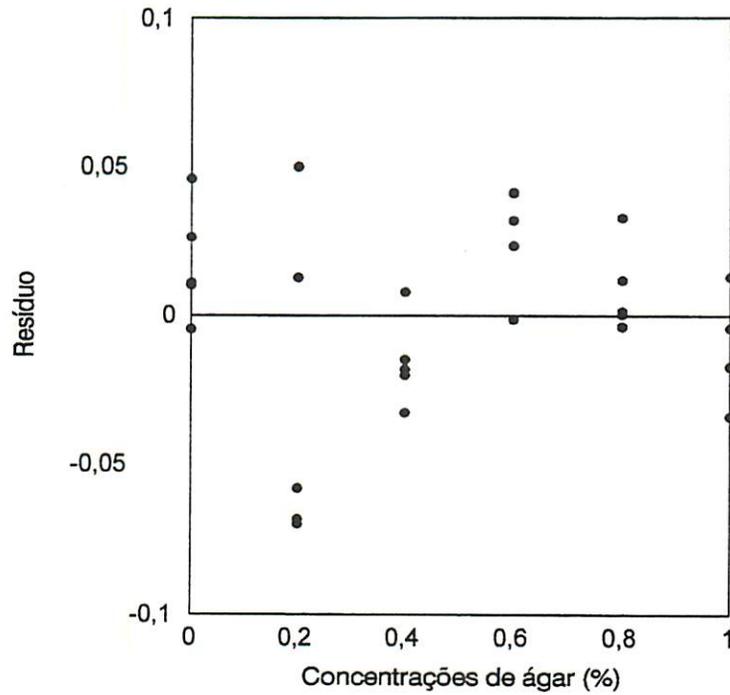


FIGURA 39. Análise de resíduos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Matua', em função da concentração de ágar, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

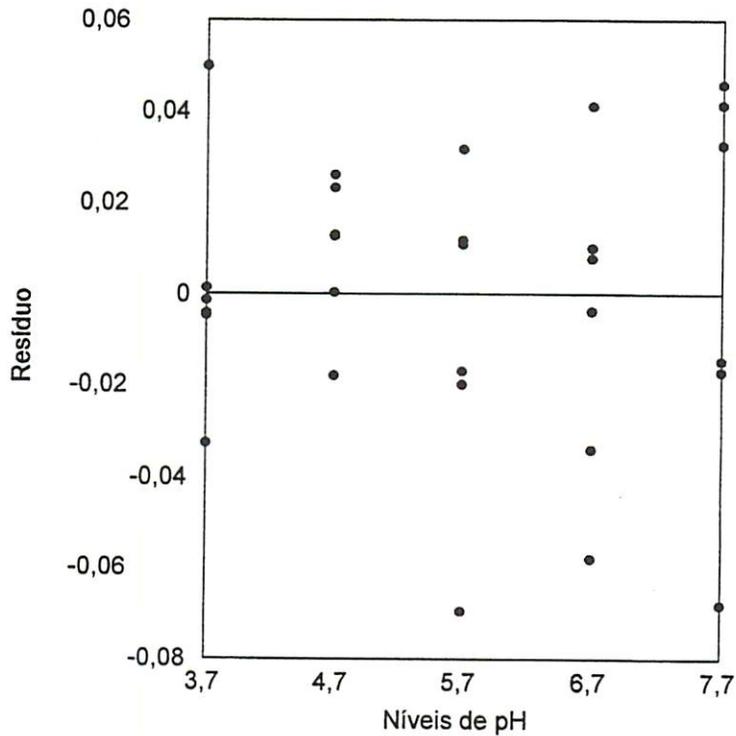


FIGURA 40. Análise de resíduos para peso da matéria seca da parte aérea de brotações da cultivar 'Matua', em função do nível de pH, após 45 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras-MG, 1996.

No cultivo *in vitro* da cultivar 'Matua', pôde-se verificar que as melhores respostas quanto à multiplicação, alongamento e peso da matéria seca de brotações foram obtidas em meios muito ácidos, contrariando a afirmação de Pierik (1987), que menciona sobre a paralisação do crescimento e desenvolvimento *in vitro* em níveis de pH abaixo de 4,5. Porém, resultados similares foram observados, quando brotações de videira (Peixoto e Pasqual, 1995) e embriões de laranjeira 'Pera' (Ribeiro, Pasqual e Ramos, 1997) foram cultivados em meio, cujo pH foi aferido para níveis mais baixos.

Os resultados obtidos indicaram que a cultivar 'Matua' teve absorção preferencial por  $\text{NO}_3^-$ , uma vez que o seu desempenho foi melhor, para as variáveis avaliadas, em meios extremamente ácidos. O mesmo foi observado com a cultivar 'Hayward' para a obtenção de brotações com maior tamanho. Já os meios que manifestaram os maiores PMSPAs desta mesma cultivar mostraram que houve, preferencialmente, absorção de  $\text{NH}_4^+$  pelos explantes, devido ao nível de pH ser bastante alcalino, concordando com George (1993).

Em ambos os ensaios, houve alguns casos em que o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) apresentou valor baixo. Porém, isto não implica que os modelos de superfície de resposta ajustados tenham sido ruins, ocultando ou deixando de levar em consideração informações importantes, uma vez que exaustivas tentativas de inclusão de novos parâmetros aos modelos foram feitas. Um problema mais grave e frequentemente observado foi o da significância dos desvios de regressão. As análises de resíduos, no entanto, conferiram uma certa segurança quanto à validação dos modelos nesses casos. De qualquer modo, esses problemas evidenciam dificuldades inerentes à pesquisa envolvendo a cultura de tecidos vegetais, devido à existência de inúmeros fatores não controlados que conferem uma alta variabilidade, nem sempre fácil de lidar.

Após o período de cultivo dos explantes, constatou-se a variação do pH do meio de cultura, tanto para a cultivar 'Hayward' (Tabela 5) como para a 'Matua' (Tabela 6). Independentemente da concentração de ágar utilizada, houve tendência dos níveis mais baixos (3,7 e 4,7) aumentarem e dos demais abaixarem. Resultados semelhantes foram encontrados por Peixoto e Pasqual (1995), os quais verificaram a ocorrência de reações de alcalinização e acidificação nos meios ao final do cultivo.

TABELA 5. Variações observadas nos valores de pH, 45 dias após o cultivo *in vitro* da cultivar 'Hayward', em função da concentração de ágar e do nível de pH ajustado inicialmente. UFLA, Lavras-MG, 1996.

Concentrações de Ágar (%)	Níveis de pH				
	3,7	4,7	5,7	6,7	7,7
0.0	4,68	4,62	4,71	4,85	5,25
0.2	5,05	4,96	5,41	5,55	5,58
0.4	5,27	5,45	5,32	5,62	5,56
0.6	5,66	5,50	5,47	5,29	5,49
0.8	5,51	5,10	5,26	5,42	5,39
1.0	5,39	5,29	5,27	5,36	5,30

TABELA 6. Variações observadas nos valores de pH, 45 dias após o cultivo *in vitro* da cultivar 'Matua', em função da concentração de ágar e do nível de pH ajustado inicialmente. UFLA, Lavras-MG, 1996.

Concentrações de Ágar (%)	Níveis de pH				
	3.7	4.7	5.7	6.7	7.7
0.0	4,37	4,43	4,44	5,29	5,07
0.2	5,33	5,10	5,28	5,18	5,28
0.4	4,99	5,01	5,06	4,95	5,02
0.6	5,11	4,51	4,88	4,94	4,95
0.8	4,93	5,00	4,88	4,84	4,49
1.0	4,85	4,68	4,69	4,67	4,68

Como observado por Wolfe, Chin e Eck (1986) e Oliveira (1994), independente do pH ajustado inicialmente, todos os meios mostraram-se bastante ácidos. Wolfe, Chin e Eck (1986) associaram a redução do pH do meio nutritivo à liberação de prótons [H<sup>+</sup>] pelas raízes dos explantes.

Mesmo empregando concentrações de ágar mais elevadas (0,8 a 1,0%), observou-se que estas não foram capazes de evitar que o valor do pH se alterasse, apresentando-se ácido. Isto está de acordo com Peixoto e Pasqual (1995), porém divergindo de Singha (1982), que relatou que a adição de ágar, assim como o aumento de sua concentração promoveu redução da acidificação do meio.

A causa da variação do pH, conforme Mezzetti, Rosati e Casalicchio (1991), pode ser atribuída à presença de explantes, bem como à troca iônica entre estes e o meio, refletindo assim na intensidade de absorção e liberação de íons. Segundo estes autores, o declínio do pH está relacionado à absorção de vários cátions (especialmente  $\text{NH}_4^+$ ) e o aumento imediato corresponde a uma maior absorção de  $\text{NO}_3^-$ , provavelmente devido à utilização total de  $\text{NH}_4^+$  disponível no meio.

Portanto, além da autoclavagem (Skirvin et al., 1986 e Pasqual, Ribeiro e Barros, 1992), a alteração do pH pode estar relacionada à absorção diferencial de íons pelas células bem como, à excreção de produtos metabólicos para o meio (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990 e George, 1993).

As cultivares, na maioria dos tratamentos, apresentaram alta incidência de calo, exceto quando o ajuste do pH foi efetuado para 5,7 ou níveis mais baixos, em meios contendo 0,2% de ágar e também, quando o pH 3,7 foi combinado com 0,4% de ágar. Nestes, a presença de calo foi totalmente extinta na cultivar 'Hayward' e bastante reduzida na cultivar 'Matua'.

A ocorrência de raízes em microestacas da cultivar 'Hayward' foi bem mais acentuada em meio líquido do que em meios solidificados. As raízes adventícias formadas foram observadas surgindo do calo e da haste. As mesmas apresentaram-se longas e finas e ainda, bem ramificadas e pilosas. Contudo, não houve a formação de raízes na concentração 0,2% de ágar, salvo quando o pH foi ajustado para 5,7 ou níveis mais elevados, sendo nestes tratamentos, a frequência de raízes extremamente reduzida. De modo geral, em brotações da cultivar 'Matua', a formação de raízes foi também bastante insignificante na maioria das concentrações de ágar utilizadas, porém estas não foram observadas quando utilizou-se 1,0% de ágar.

Raras vezes, as cultivares apresentaram brotações com ápices necrosados, sendo esse sintoma também constatado por Sha, McCown e Peterson

(1985) em ápices de brotações de *Solanum tuberosum*, porém em maior intensidade. Segundo esses autores, a incidência de necrose e conseqüentemente, a redução do vigor de plântulas *in vitro*, está associada à deficiência de cálcio. Esses afirmaram ainda que, o Parafilm usado para vedar os recipientes, promoveu a necrose apical; no entanto, este problema pode ser contornado, com o aumento do nível de cálcio no meio de cultura.

## **5 CONCLUSÕES**

### **5.1 Ensaio 1 e 2: Influência da concentração do meio de cultura (MS) e de sacarose na multiplicação *in vitro* das cultivares 'Hayward' e 'Matua'**

#### **5.1.1 Número de brotações**

A cultivar 'Hayward' apresenta maior número de brotações na combinação de 117,31% de meio de MS com 36,10 g/l de sacarose; enquanto que, para a cultivar 'Matua', este número é favorecido em meio contendo 98,46% de nutrientes e 13,90 g/l de sacarose.

#### **5.1.2 Comprimento de brotações**

Quanto ao comprimento de brotações, a melhor resposta para a cultivar 'Hayward' é a combinação de 200% de MS com 36,30 g/l de sacarose; no entanto, para a 'Matua', quando 35,20 g/l de sacarose são adicionados ao meio contendo 163,51% de nutrientes.

#### **5.1.3 Peso da matéria seca da parte aérea de brotações**

O PMSPA é considerado ótimo para a cultivar 'Hayward', empregando-se 134,96% de MS com 48,70 g/l de sacarose; porém, para a 'Matua', quando associam-se 134,63% de MS com 51,60 g/l de sacarose.

## **5.2 Ensaio 3 e 4: Influência da concentração de ágar e do nível de pH na multiplicação *in vitro* das cultivares 'Hayward' e 'Matua'**

### **5.2.1 Número de brotações**

O melhor resultado relativo ao número de brotações da cultivar 'Hayward' é obtido no nível 5,85 de pH combinado com 0,82% de ágar; todavia a cultivar 'Matua', na combinação do pH 3,70 com 0,62% de ágar.

### **5.2.2 Comprimento de brotações**

As brotações da cultivar 'Hayward' alcançam tamanho superior na combinação do pH 4,70 com 0,45% de ágar; contudo, a cultivar 'Matua', combinando-se o nível 4,28 de pH e 0,48% de ágar.

### **5.2.3 Peso da matéria seca da parte aérea de brotações**

O PMSPA mais efetivo para a cultivar 'Hayward' é beneficiado em meio solidificado com 0,39% de ágar e pH ajustado para 7,70; quanto à cultivar 'Matua', este ocorre na combinação de 0,53% de ágar e 3,70 de pH.

## **5.2 Ensaio 3 e 4: Influência da concentração de ágar e do nível de pH na multiplicação *in vitro* das cultivares 'Hayward' e 'Matua'**

### **5.2.1 Número de brotações**

O melhor resultado relativo ao número de brotações da cultivar 'Hayward' é obtido no nível 5,85 de pH combinado com 0,82% de ágar; todavia a cultivar 'Matua', na combinação do pH 3,70 com 0,62% de ágar.

### **5.2.2 Comprimento de brotações**

As brotações da cultivar 'Hayward' alcançam tamanho superior na combinação do pH 4,70 com 0,45% de ágar; contudo, a cultivar 'Matua', combinando-se o nível 4,28 de pH e 0,48% de ágar.

### **5.2.3 Peso da matéria seca da parte aérea de brotações**

O PMSPA mais efetivo para a cultivar 'Hayward' é beneficiado em meio solidificado com 0,39% de ágar e pH ajustado para 7,70; quanto à cultivar 'Matua', este ocorre na combinação de 0,53% de ágar e 3,70 de pH.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBIERI C.; MORINI, S. Plant from *Actinidia* callus cultures. **Journal of Horticultural Science**, Ashford Kent, v.62, n.1, p.107-109, Jan. 1987.
- BOX, G.E.P.; DRAPER, N.R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: John Wiley e Sons, 1987. 669p
- BRAND, M.H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.35, n.3, p.203-209, Dec. 1993.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.37-70.
- CACIOPPO, O. **O cultivo do quivi**. Lisboa: Editorial Presença, 1989. 123 p.
- CANHOTO, J.M.; CRUZ, G.S. In vitro multiplication of *Actinidia chinensis* Planch. by culture of young leaves. **Boletim da Sociedade Broteriana**, Coimbra, v.60, n.2, p.239-252, Dec.1987.
- CHIARIOTTI, A.; CABONI, E.; FRATTARELLI, A. Shoot regeneration from *in vitro* roots of kiwi. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.289, p.97-99, 1991.
- CHONG, C.; PUA, E.-C. Carbon nutrition of Ottawa 3 apple rootstock during stages of *in vitro* propagation. **Journal of Horticultural Science**, Ashford Kent, v.60, n.3, p.285-290, July 1985.
- DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 59, p.270-276, 1983.
- DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 2.ed. New York: John Wiley e Sons, 1981. 709p.

- FAERTES, V. Kiwi: cultivo caro e difícil, mas lucrativo. **Machete Rural**, Rio de Janeiro, n.43, p. 42-43, out. 1990.
- FIORINO, P.; LORETI F. Propagation of fruit trees by tissue culture in Italy. **HortScience**, Alexandria, v.22, n.3, p.353-358, June 1987.
- FORTES, G.R.de L.; SANTOS FILHO, B.G.; COFCEWIZ, E.T.; QUINTANILHA, L.F.; FERNANDES, M.L.D. Uso do regulador de crescimento thidiazuron na multiplicação *in vitro* do kiwi (*Actinidia deliciosa*) cv. Matua. **Revista Brasileira de Fisiologia**, Londrina, v. 5, n. 1, p. 101, jun. 1993. (Resumo, 250).
- FORTES, G.R.de L.; SANTOS FILHO, B.G.; BONATO, A.L.; ZANCO, J.J. Obtenção de calos e brotações adventícias em tecido somático de kiwi pré-condicionado em 2,4-D. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 14, n. 1, p.65-69, abr. 1992.
- GEORGE, E.F. The components of culture media. In: \_\_\_\_\_. **Plant propagation by tissue culture**. 2.ed. Great Britain: Exegetics Limited, 1993. cap. 9, p.273-343.
- GHASHGHAIE, J.; BRECKMANN, F.; SAUGIER, B. Effects of agar concentration on water status and growth of rose plants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 82, n. 1, p.73-78, May 1991.
- GONZÁLEZ, M.V.; REY, M.A.; REVILLA, M.A.; RODRÍGUEZ, R. Morphogenetic patterns in kiwi tissue culture and after *Agrobacterium* co-culture. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.282, p.359-366, 1990.
- GRATTAPAGLIA, D. MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.L.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990. p.99-170.
- GRIBAUDO, I. ; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 8, p.1083, Aug. 1991.
- GUI, Y.L. Induction of callus and regeneration de plantlet in stem segment culture of chinese gooseberry. **Acta Botanica Sinica**, v. 21, n. 4, p.339-344, 1979. In: **HORTICULTURAL ABSTRACT**, Farnham Royal, v. 50, n.8, p.505, 1980 (Abst. 6106).
- HIRSCH, A.M.; FORTUNE, D.; XIAO, X.G.; BLANCHET, P. Somaclonal variations related to kiwi fruit micropropagation, study of fruitful male plants and use of peroxidase as an early sex marker. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.1, n.297, p.123-131, Apr. 1991.

- HYNDMAN, S.E.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. The role of sucrose and nitrogen in adventitious root formation on cultures rose shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.1, n.4, p.229-238, 1982.
- JUNQUEIRA, W.R. Cultura do kiwi. **Informativo SBF**, Capinas, v.7, n.3, p. 13-14, set. 1988.
- KAMENICKÁ, A.; RYPÁK, M. The regeneration of *Actinidia chinensis* Planch. cultured *in vitro*. **Pol'nohospodárstvo**, v.35, n.9, p.811-818, 1989. In: **HORTICULTURAL ABSTRACT**, Farnham Royal, v. 60, n.6, p.476, 1990 (Abst. 4156).
- KEVERS, C.; COUMANS, M.; COUMANS-GILLES, M.-F.; GASPAR, T. Physiological and biochemical event leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.61, n.1, p.69-74, May 1984.
- KOVAC, J. Micropropagation of *Actinidia kolomikta*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.35, n.3, p.301-303, Dec. 1993.
- LANGFORD, P.J.; WAINWRIGHT, H. Effects of sucrose concentration on the photosynthesis ability of rose shoots *in vitro*. **Annals of Botany**, London, v. 60, n.6, p.633-640, Dec. 1987.
- LEVA, A.R. Tests on organogenesis from callus of *Actinidia chinensis*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.2, n.179, p. 883-884, 1986.
- LEVA, A.R.; MULEO, R. Effects of "media osmotic agents" on the growth and morphogenesis of *Actinidia deliciosa* cv. 'Hayward' callus. **In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant**, Columbia, v. 29P, n. 2, p.59-64, Apr. 1993.
- MARINO, G. BATTISTINI, S. Leaf-callus growth, shoot regeneration and somaclonal variation in *Actinidia deliciosa*: effect of media pH. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 280, p.37-44, 1990.
- MARINO, G. BERTAZZA, G. Micropropagation of *Actinidia deliciosa* cvs. 'Hayward' and 'Tomuri'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.45, p.65-74, 1990.
- MEZZETTI, B.; CONTE, L.S.; ROSATI, P. *Actinidia deliciosa* *in vitro*. II. Growth and exogenous carbohydrates utilization by explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p.153-160, Sept. 1991.
- MEZZETTI, B.; ROSATI, P.; CASALICCHIO, G. *Actinidia deliciosa* C.F. Liang *in vitro*. I. Growth and mineral uptake by explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p.91-98, May 1991.
- MII, M.; OHASHI, H. Plantlet regeneration from protoplasts of kiwifruit, *Actinidia chinensis* Planch. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 230, p.167-170, Sept. 1988.

- MONETTE, P.L. Micropropagation of kiwifruit using non-axenic shoot tips. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.6, n.1, p.73-82, 1986.
- MORAES, E.C.; NUNES, A.M.; MONKS, P.; FORTES, G.R. de L.; SANTOS FILHO, B.G. Obtenção de calos e brotações adventícias em tecido somático de kiwi e suplementado com thidiazuron. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.5, n.1, p.101, jun. 1993.
- MU, S.K.; FRASER, L.G.; HARVEY, C.F. Initiation of callus and regeneration of plantlets from endosperm of *Actinidia* interspecific hybrids. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.44, n. 1, p.107-117, 1990.
- MULEO, R.; MORINI, S. Effect of light quality on regeneration from callus of *Actinidia deliciosa*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 280, p.155-158, 1990.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p.473-497, 1962.
- NACHTIGAL, J.C.; ZECCA, A.G.D.; FIGUEIREDO, S.L.B.; FORTES, G.R. de L. Influência da benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de kiwi (*Actinidia deliciosa*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 1, p. 23-26, jan./abr. 1995.
- NIEUWKERK, J.P. Van; ZIMMERMAN, R.H. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 3, p. 516-518, June 1986.
- OLIVEIRA, M.M.; PAIS, M.S.S. Plant regeneration from protoplasts of long-term callus cultures of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward (kiwifruit). **Plant Cell Reports**, Berlin, v.9, n.11, p.643-646, 1991.
- OLIVEIRA, M.M.; PAIS, M.S.S. Somatic embryogenesis in leaves and leaf-derived protoplast of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward (kiwifruit). **Plant Cell Report**, Berlin, v.11, n. 5-6, p.314-317, Feb. 1992.
- OLIVEIRA, P.D. de. **Propagação "in vitro" de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.)** Orange Reagen. Lavras: ESAL, 1994. 116 p. (Dissertação - mestrado em Fitotecnia)
- PAIS, M.S.S.; OLIVEIRA, M.M.; BARROSO, J. Use petiole segments of *Actinidia chinensis* (kiwi) for plant differentiation and production of friable calli for protoplast isolation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.212, p.687-690, 1987.

- PASQUAL, M.; RIBEIRO, V.G.; BARROS, I. de. Influência da chapa aquecedora e autoclave sobre pH do meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p.603-608, abr. 1992.
- PASQUALETTO, P.L.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of 'Gala' apple in vitro. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 111, n. 6, p.976-980, Nov. 1986.
- PASQUALETTO, P.L.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. The influence of  $K^+$ ,  $Mg^+$  and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 14, p.31-40, 1988.
- PEDROSO, M.C.; OLIVEIRA, M.M.; PAIS, M.S.S. Micropropagation and simultaneous rooting of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* Hayward. **HortScience**, Alexandria, v.27, n. 5, p.443-445, May 1992.
- PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Micropropagação da videira: efeitos do pH e do ágar. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 42, n. 242, p. 431-443, jul./ago. 1995.
- PERUZZO, E.L.; DAL BÓ, M.A. Propagação da videira e do quivi pela enxertia de garfagem a campo. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 5, n. 2, p. 45-47, jun. 1992.
- PIAGNANI, C.; ECCHER, T.; CASTELLI, S. Micropropagation of *Actinidia chinensis*: effects of growth regulations on proliferation rate. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 2, n. 179, p. 887-890, 1986.
- PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht: Martinus Nyhoff Publishers, 1987. 344p.
- RADICE, S. Néof ormation de bourgeons sur des explants foliaires d' *Actinidia chinensis* Planch. cultivés *in vitro*. **Comptes Rendus des Seances de la Société de Biologie et des ses Filiales**, Paris, v. 186, n. 5, p. 470-476, nov. 1992.
- REVILHA, M.A.; POWER, J.B. Morphogenetic potential of long-term callus cultures of *Actinidia deliciosa*. **Journal of Horticultural Science**, Ashford Kent, v. 63, n.3, p.541-545, Dec. 1988.
- REVILLA, M.A.; REY, M.A.; GONZALEZ-RIO, F.; GONSALEZ, M.V.; DIAZ-SALA, C.; RODRIGUEZ, R. Micropropagation of kiwi (*Actinidia* spp.). In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. v.18, p.399-423.

- REY, M.; FERNÁNDEZ, T.; GONZÁLEZ, V.; RODRÍGUEZ, R. Kiwifruit micropropagation through callus shoot-bud induction. *In vitro celular and developmental biology. Plant*, Columbia, v.28P, n. 3, p.148-152, July 1992.
- RIBEIRO, V.G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D. Influência do pH e do ágar sobre o cultivo *in vitro* de embriões de laranjeira 'Pera'. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 1997. (no prelo)
- ROMBERGER, J.A.; TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot meristem in culture. I. Agar and autoclaving effects. *American Journal Botany*, Columbus, v. 58, n. 2, p.131-140, Feb. 1971.
- SAMMARCELLI, F.; LEGAVE, J.M. Multiplication *in vitro* par néoformation chez l'*Actinidia deliciosa*, cultivar Hayward. *Fruits*, Paris, v.45, n. 4, p.393-401, juil./août. 1990.
- SAMMARCELLI-OLLITRAULT, F.; LEGAVE, J.M. *In vitro* irradiation of the cultivar Hayward. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v. 1, n. 297, p. 115-121, 1991.
- SANTOS, A.M. dos. Kiwi no Brasil: um cultivo que requer cautela. *HortiSul*, Pelotas, v.1, n. 2, p. 36-39, 1990.
- SAQUET, A.A.; BRACKMANN, A. A cultura do Kiwi. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.25, n. 1, p. 177-182, jan./abr. 1995.
- SCHUCK, E. Cultivares de quivi. *Agropecuária Catarinense*, Florianópolis, v. 5, n. 4, p. 9-12, dez. 1992a.
- SCHUCK, E. Propagação do quivi. *Agropecuária Catarinense*, Florianópolis, v. 5, n. 4, p. 13-18, dez. 1992b.
- SCHUCK, E. Quebra de dormência com produtos químicos em quivi. *Agropecuária Catarinense*, Florianópolis, v. 7, n. 2, p. 42-46, jun. 1994.
- SHA, L.; McCOWN, B.H.; PETERSON, L.A. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. *Journal of the American Society for Horticulturae Science*, Alexandria, v.10, n.5, p.631-634, 1985.
- SHEN, X.-S.; WAN, J.-L.; LUO, W.-Y. Propagation *in vitro* of chinese gooseberry (*Actinidia chinensis*) through the development of axillary buds. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 45-54, 1990.
- SINGHA, S. Influence of agar concentration on in vitro shoot proliferation of *Malus* sp 'Almey' and *Pyrus communis* 'Seckel'. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 107, n. 4, p.657-660, July 1982.

- SINGHA, S. Influence of two commercial agar on *in vitro* proliferation of 'Almey' crabapple and 'Seckel' pear. **HortScience**, Alexandria, v. 19, n. 2, p.227-228, Apr. 1984.
- SINGHA, S.; OBERLY, G.H.; TOWNSEND, E.C. Changes in nutrient composition and pH of culture medium during *in vitro* shoot proliferation of crabapple and pear. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 2, p.209-220, 1987.
- SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; MANN, M.L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T. Stability of tissue culture medium pH as function of autoclaving, time and cultured plant material. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 5, p.292-294, 1986.
- SMITH, R.H. Media components and preparation. In:\_\_\_\_\_.**Plant tissue culture: Techniques and experiments**. San Diego: Academic Press, 1992. cap. 2, p.7-18.
- SUTTER, C.G.; SHACKEL, K.; DIAZ, J.C. Acclimatization of tissue culture plants. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 314, p. 115-119, Dec. 1992.
- TOMIOKA, E.H. **Propagação vegetativa de sete cultivares de kiwi através do enraizamento de estacas de caule, sob condições de nebulização**. Botucatu: UNESP, 1995. 80 p. (Dissertação - mestrado em Horticultura)
- TREMBLAY, L.; TREMBLAY, F.M. Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill) B.S.P.) and red spruce (*P. rubens* Sarg.) somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 27, n. 1, p.95-103, Oct. 1991.
- VENDRAMINI, M. Safra de kiwi depende de uma boa polinização. **Folha de São Paulo**, v. 3, n. 147, abr. 1989. Agrofolha, p. 6.
- WANG, D.; GUI, Y.L.; SUN, J.S. Tissue culture of fruit crops in China. **HortScience**, Alexandria, v.23, n.6, p.962-965, Dec.1988.
- WESSELS, E.; NEL, D.D.; STADEN, D.F.A. von. *In vitro* propagation of *Actinidia chinensis* Pl. cultivar Hayward. **Deciduous Fruit Grower**, Cape Town, v. 34, n. 12, p.453-457, Dec. 1984.
- WIYAPORN, S.; SUBHADRABANDHU, S.; SAHAVACHARIN, O. *In vitro* vegetative multiplication of kiwi plant. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 279, p. 447-459, 1990.
- WOLFE, D.; CHIN, C.K.; ECK, P. Relationship of the pH of medium to growth of 'Bluecrop' highbush blueberry *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v.21, n.2, p.296-298, Apr. 1986.

- XIAO, X.G.; HIRSCH, A.-M.; FORTUNE, D. Régénération du kiwi (*Actinidia deliciosa* cultivar Hayward) à partir de jeunes feuilles. **Fruits**, Paris, v. 46, n. 1, p. 57-66, jan./fév. 1991.
- ZECCA, A.G.D.; FORTES, G.R. de L. Enraizamento in vitro de kiwi (*Actinidia deliciosa*), cv. Hayward. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 5, n. 1, p. 109-110, jun. 1993.
- ZECCA, A.G.D.; NACHTIGAL, J.C.; FIGUEIREDO, S.L.B.; FORTES, G.R. de L. Multiplicação in vitro de kiwi (*Actinidia deliciosa*), cv. Tomuri. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 5, n. 1, p. 101, jun. 1993 (Resumo, 253).

## **ANEXOS**

TABELA 1A. Composição do meio nutritivo "MS" (Murashige e Skoog, 1962)

Componentes	Concentrações	
	mg/l	mM
<b>Macronutrientes:</b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20,60
KNO <sub>3</sub>	1900	18,80
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440	2,99
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	370	1,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,25
<b>Micronutrientes:</b>		
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	22,3	0,100
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	8,6	0,0299
H <sub>3</sub> B <sub>3</sub>	6,2	0,100
KI	8,3	0,005
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,001
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,0001
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,0001
<b>Fe EDTA:</b>		
Na <sub>2</sub> EDTA . 2H <sub>2</sub> O	37,3	0,100
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27,8	0,100
Glicina	2,0	0,0266
Ácido nicotínico	0,5	0,004
Piridoxina. HCl	0,5	0,0024
Tiamina. HCl	0,1	0,0003
Mio-inositol	100	0,55
Sacarose	30000	87,6

Fonte: Caldas, Haridasan e Ferreira (1990).

TABELA 2A. Concentrações (mM) dos componentes do meio MS de acordo com as percentagens utilizadas nos tratamentos. UFLA, Lavras-MG, 1996.

Componentes	Tratamentos (%)				
	0	50	100	150	200
<b>Macronutrientes:</b>					
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	10,300	20,60	30,900	41,20
KNO <sub>3</sub>	-	9,400	18,80	28,200	37,60
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	-	1,495	2,99	4,485	5,98
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	-	0,750	1,50	2,250	3,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0,625	1,25	1,875	2,50
<b>Micronutrientes:</b>					
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	-	0,05000	0,1000	0,15000	0,2000
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	-	0,01495	0,0299	0,04485	0,0598
H <sub>3</sub> B0 <sub>3</sub>	-	0,05000	0,1000	0,15000	0,2000
KI	-	0,00250	0,0050	0,00750	0,0100
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	-	0,00050	0,0010	0,00150	0,0020
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	-	0,00005	0,0001	0,00015	0,0002
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	-	0,00005	0,0001	0,00015	0,0002
<b>Fe EDTA:</b>					
Na <sub>2</sub> EDTA . 2H <sub>2</sub> O	-	0,05	0,100	0,15	0,20
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	-	0,05	0,100	0,15	0,20
<b>Aminoácido:</b>					
Glicina	-	0,0133	0,0266	0,0399	0,0532
<b>Vitaminas:</b>					
Ácido nicotínico	-	0,00200	0,0040	0,00600	0,0080
Piridoxina . HCl	-	0,00120	0,0024	0,00360	0,0048
Tiamina . HCl	-	0,00015	0,0003	0,00045	0,0006
Mio-inositol	-	0,275	0,55	0,825	1,10

