

CLÓVIS MAURÍLIO DE SOUZA

ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS *IN VIVO* E PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE REPOLHO (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.)

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. PhD. JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1995**

FICHA CATALOGRÁFICA PREPARADA PELA SEÇÃO DE CATALOGAÇÃO E
CLASSIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFLA

Souza, Clóvis Maurílio de.

Enraizamento de microestacas *in vivo* e propagação *in vitro* de repolho (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.). / Clóvis Maurílio de Souza.--Lavras : UFLA, 1995.

76 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Repolho - Estacas - Enraizamento. 2. Propagação *in vitro*. 3. Regulador de crescimento. 4. Micropropagação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

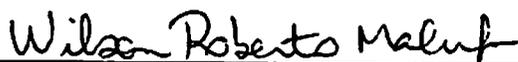
CDD-635.3435

CLÓVIS MAURÍLIO DE SOUZA

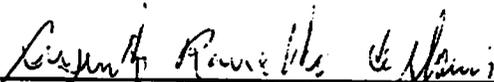
**ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS *IN VIVO* E PROPAGAÇÃO
IN VITRO DE REPOLHO (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.)**

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 14 de julho de 1995



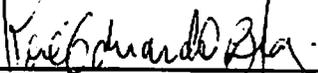
Prof. Wilson Roberto Maluf



Prof. Augusto Ramalho de Moraes



Pesq. Djalma Miranda Carvalho Teixeira



**Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
(Orientador)**

À minha esposa Ilma de Carvalho Souza

À meu filho Henrique Carvalho de Souza

OFEREÇO

Àos meus pais José Cândido de Souza

Therezinha Seraphim de Souza

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo.

À Universidade Federal de Lavras - UFLA, pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Professor José Eduardo B.P. Pinto, pela orientação, incentivo, amizade e confiança demonstrados em todos os momentos.

Ao Professor Wilson Roberto Maluf pelos ensinamentos transmitidos, participação e sugestões apresentadas.

Ao Professor Augusto Ramalho de Moraes, pela participação e sugestões apresentadas.

Ao Pesquisador Djalma Carvalho Miranda Teixeira, pela participação e sugestões apresentadas.

Ao Professor Daniel Furtado Ferreira, pela amizade e colaboração.

Ao Francisco Resende Vilela, pela amizade e colaboração.

Ao Arie F. Blank, pela amizade e colaboração.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, Renato, José Magno, Aguinaldo, Beni, Aurora, Dulcimara, Patrícia, Marly e Sérgio, pela amizade e agradável convívio.

Aos academicos e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos, Polyana, Eduardo, Fidelis, Vanessa, Ana Lygia, Solange, Flávia, Neusa e Vicentina pela amizade e agradável convívio.

Aos laboratoristas Evaldo Arantes de Souza e Vantuil Rodrigues, pelos auxílios prestados, amizade e agradável convívio.

Aos colegas Ângela, João Cândido, Ivan, Alcino, Paulo Edson e demais colegas pela amizade e agradável convívio.

Aos funcionários da Biblioteca da UFLA, pelo atendimento e correção das referências bibliográficas.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Agricultura, pelos auxílios prestados e a todos que, de algum modo, contribuíram para o êxito deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
2 INDUÇÃO DE ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE REPOLHO <i>IN VIVO</i>	6
RESUMO	6
2.1 REFERENCIAL TEÓRICO	7
2.2 OBJETIVO	9
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	10
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
2.5 CONCLUSÃO	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
3 EFEITO DE DIFERENTES CITOCININAS NA INDUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE BROTOS ADVENTÍCIOS DE SEGMENTOS NODAIS DE REPOLHO <i>IN VITRO</i>	18
RESUMO	18
3.1 REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.2 OBJETIVOS	26
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.3.1 Estabelecimento da cultura <i>in vitro</i>	27
3.3.1.1 Coleta do material	27
3.3.1.2 Desinfestação das gemas	27
3.3.1.3 Inoculação	28
3.3.2 Fase de multiplicação	29
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.4.1 Experimento 1 - Efeito de diferentes citocininas	31

	Página
3.4.2 Experimento 2 (A) - Efeito de diferentes níveis de TDZ	35
3.4.3 Experimento 2 (B) - Efeito de diferentes níveis de TDZ	41
3.5 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
4 EFEITO DA CONSISTÊNCIA DO MEIO DE CULTURA E TIPO DE TAMPA NA MICROPROPAGAÇÃO DO REPOLHO	50
RESUMO	50
4.1 REFERENCIAL TEÓRICO	51
4.2 OBJETIVOS	55
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.4.1 Experimento 1 - Consistência do meio de cultura	57
4.4.2 Experimento 2 - Tipos de tampas	64
4.5 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
6 CONSIDERAÇÕES GERAIS	75

LISTA DE QUADROS

Quadro		Página
01	Número de microestacas enraizadas e número de raízes totais das famílias clonais 007 e 800, em cinco concentrações de AIB suplementado com ácido bórico (100 mg/L) e sacarose (20 g/L)	14
02	Resumo das análises de variância para número e comprimento de brotos, peso da matéria fresca e matéria seca do clone 400 em três tipos de citocininas	31
03	Resumo das análises de variância para número de brotos, comprimento médio de brotos, peso da matéria fresca e peso da matéria seca da família clonal 007 em diferentes concentrações de TDZ	35
04	Resumo das análises de variância para número de brotos, comprimento médio de brotos, peso da matéria fresca e peso da matéria seca da família clonal 007 em diferentes concentrações de TDZ	41
05	Resumo das análises de variância para número e comprimento médio de brotos, número de folhas por broto, peso de matéria fresca e de matéria seca do clone 400, cultivados em meio líquido ou semi-sólido	58
06	Resumo das análises de variância para número de brotos, comprimento médio de broto, peso da matéria fresca e matéria seca do clone 800 utilizando três tipos de tampas	65
07	Resumo das análises de variância para número de raiz, comprimento médio de raiz, peso da matéria fresca e da matéria seca do clone 800 utilizando três tipos de tampas	69

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
01	Amostra do experimento de enraizamento de estacas mostrando as microestacas em bandejas de isopor contendo como substrato uma mistura de casca de arroz carbonizada e Plantimax ^R	11
02	Representação gráfica das porcentagens de brotações da família clonal 007, em função das diferentes concentrações de AIB e do tratamento adicional de AIB + ácido bórico + sacarose	12
03	Representação gráfica do número médio de raízes, em função de diferentes concentrações de AIB para as famílias clonais 007 e 800	15
04	Representação gráfica do comprimento médio de raízes, em função de diferentes concentrações de AIB para as famílias clonais 007 e 800	15
05	Representação gráfica do número de brotos por frasco produzidos através de segmentos nodais do clone 400, em função das citocininas (BAP, TDZ e Kin)	32
06	Representação gráfica dos valores médios de comprimento de brotos produzidos através de segmentos nodais do clone 400 em função das citocininas (BAP, TDZ e Kin)	33
07	Representação gráfica dos valores médios de peso de matéria fresca de brotos produzidos através de segmentos nodais do clone 400, em função das citocininas (BAP, TDZ e Kin)	34
08	Representação gráfica dos valores médios de peso de matéria seca de brotos produzidos através de segmentos nodais do clone 400, em função das citocininas (BAP, TDZ e Kin)	34
09	Representação gráfica dos valores médios e da equação de regressão para número de brotos adventícios obtidos através de segmentos nodais da família clonal 007, em função de diferentes níveis de TDZ	36
10	Representação gráfica dos valores médios e da equação de regressão para comprimento de brotos adventícios obtidos através de segmentos nodais da família clonal 007, em função de diferentes níveis de TDZ	36

Figura	Página
11	Brotos obtidos do cultivo <i>in vitro</i> da família clonal 007 em diferentes níveis de TDZ. a) brotações obtidas a partir do explante primário, b) número de brotos isolados do explante primário e c) comparação de brotos obtidos entre o tratamento com 3,0 mg/L de TDZ (1) e o tratamento sem TDZ (2) 38
12	Representação gráfica de valores médios e da equação de regressão para peso de matéria fresca de brotos adventícios obtidos através de segmentos nodais da família clonal 007, em função de diferentes níveis de TDZ 39
13	Representação gráfica dos valores médios e de regressão para peso de matéria seca de brotos adventícios obtidos através de segmentos nodais da família clonal 007, em função de diferentes níveis de TDZ 39
14	Representação gráfica dos valores médios e da equação de regressão para número de brotos adventícios obtidos através de segmentos nodais da família clonal 007, em função de diferentes níveis de TDZ 42
15	1 - brotos adventícios obtidos a partir do explante primário da família clonal 007 em diferentes níveis de TDZ (exp. B); 2 - amostra do número de brotos isolados a partir do explante primário 43
16	Representação gráfica dos valores médios e da equação de regressão para comprimento de brotos adventícios obtidos através de segmentos nodais da família o clonal 007, em função de diferentes níveis de TDZ 44
17	Representação gráfica dos valores médios e da equação de regressão para peso de matéria fresca de brotos adventícios obtidos através de segmentos nodais da família clonal 007, em função de diferentes níveis de TDZ 45
18	Representação gráfica dos valores médios e da equação de regressão para peso de matéria seca de brotos adventícios obtidos através de segmentos nodais da família clonal 007, em função de diferentes níveis de TDZ 45
19	Representação gráfica dos valores médios de número de brotos produzidos através de segmentos nodais do clone 400, em função da consistência do meio de cultura 59
20	Representação gráfica dos valores médios de número de folhas produzidas através de segmentos nodais do clone 400, em função da consistência do meio de cultura 59
21	Representação gráfica dos valores médios de comprimento de brotos produzidos através de segmentos nodais do clone 400, em função da consistência do meio de cultura 60

Figura	Página
22	Representação gráfica dos valores médios de peso de matéria fresca de brotos produzidos através de segmentos nodais do clone 400, em função da consistência do meio de cultura 62
23	Representação gráfica dos valores médios de peso de matéria seca de brotos produzidos através de segmentos nodais do clone 400, em função da consistência do meio de cultura 62
24	a) Desenvolvimento de brotações do clone 400 cultivados em meio líquido e em meio sólido, b) e c) tipos de brotos utilizados para repicagem 63
25	Modelos de tampas (Vitafilme ^R , Metal e Plástica) utilizadas em laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais 64
26	Representação gráfica dos valores médios de número e comprimento de brotos produzidos através de segmentos nodais da família clonal 800, em função dos tipos de tampas 65
27	Representação gráfica dos valores médios de peso de matéria fresca dos brotos produzidos através de segmentos nodais da família clonal 800, em função dos tipos de tampas 67
28	Representação gráfica dos valores médios de peso de matéria seca dos brotos produzidos através de segmentos nodais da família clonal 800, em função dos tipos de tampas 68
29	Representação gráfica de valores médios de número de raiz produzida através de segmentos nodais da família clonal 800, em função dos tipos de tampas 69
30	Representação gráfica de valores médios de comprimento de raiz produzidas através de segmentos nodais da família clonal 800, em função dos tipos de tampas 70
31	Representação gráfica de valores médios de peso de matéria fresca de raiz produzida através de segmentos nodais da família clonal 800, em função dos tipos de tampas 71
32	Representação gráfica de valores médios de peso de matéria seca de raiz produzida através de segmentos nodais da família clonal 800, em função dos tipos de tampas 71

LISTA DE ABREVIATURAS

ANA - ácido naftalenoacético

AIA - ácido indolacético

AIB - ácido indolbutírico

BA - benziladenina

BAP - 6-benzilaminopurina

TDZ - thidiazuron

Kin - cinetina

2ip - 6-dimetil alil amino purina

MS - Murashige e Skoog

LS - Linsmayer e Skoog

RESUMO

SOUZA, Clóvis Maurílio de. **Enraizamento de microestacas *in vivo* e propagação *in vitro* de repolho (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.)**. Lavras: UFLA, 1995. 84 p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).*

O repolho (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) originário da costa do Atlântico e Mediterrâneo na Europa. Recentemente, o repolho tornou-se o vegetal, dentre as brássicas, mais cultivado em muitos países de clima temperado. No Brasil o repolho é bastante cultivado devido ao desenvolvimento de variedades melhoradas, adaptadas especialmente ao cultivo de verão. O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver um protocolo de multiplicação para clones de difícil propagação, seja através de indução de enraizamento de microestacas *in vivo* ou micropropagação de segmentos nodais de repolho *in vitro*. A indução de enraizamento de microestacas das famílias clonais 007 e 800 foi realizada através da imersão da base das microestacas em soluções de ácido indol butírico (AIB 0, 5, 25 e 125 mg/L) + ácido bórico (100 mg/L) + sacarose (20 g/L), por um período de 15 horas mantidas em casa de vegetação. A indução de enraizamento de microestacas foi mais efetiva com o tratamento 125 mg/L de AIB suplementado com ácido bórico + sacarose, este tratamento teve maior frequência de microestacas enraizadas e maior número de raiz por microestacas. Nos ensaios realizados *in vitro* os fatores físicos como, consistência do meio de cultura e tipos de tampas, mostrou regeneração de brotos adventícios, mas não foi observados

* Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto. Membros da banca: Wilson Roberto Maluf, Augusto Ramalho de Moraes e Djalma Miranda Carvalho Teixeira.

diferenças significativas entre eles. O thidiazuron mostrou maior percentagem de regeneração entre 0,19 e 3,04 mg/L mas não foi observado diferenças significativas entre esses níveis. Este foi mais efetivo na regeneração de brotos do que a benzilaminopurina (BAP) e cinetina (Kin).

SUMMARY

ROOTING OF *IN VIVO* MICROCUTTINGS AND *IN VITRO* PROPAGATION OF CABBAGE (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.).

The cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) originated European coasts of the Atlantic and the Mediterranean. Recently, the cabbage has become the most widespread Brassica vegetable all over the world and is cultivated in many countries with temperate climate. At Brazil the cabbage is cultivated through of the improvement varieties, adjusted to the summer. A procedure of the propagation system *in vivo* and *in vitro* for the difficult multiplication clones is described. The base of the cuttings of conal family 800 and 007 were immersed in indolebutyric acid (IBA - 0, 5, 25 and 125 mg/L) + acid boric (100 mg/L) + sucrose (20 g/L) for 15 hours and maintained at greenhouses. Induction of roots were more effective with 125 mg/L of IBA supplemented with acid boric and sucrose. This treatment had a higher frequency of rooting and more roots per cuttings. *In vitro* system the medium consistent and cap type showed regeneration of adventitious shoot, but no significant difference was observed among them. Thidiazuron (TDZ) showed higher percentage of regeneration between 0.19 and 3.04 mg/L, but no significant difference was observed. Thidiazuron was more effective on shoot regeneration than benzyladenine and kinetin.

1 INTRODUÇÃO

O repolho, cujo nome botânico é *Brassica oleracea* L.var *capitata* L., tem como centro de origem a costa do Atlântico e Mediterrâneo na Europa.

O surgimento do repolho pode ter ocorrido através de modificações profundas da couve-selvagem, espécie que ainda hoje pode ser encontrada nas costas da Inglaterra e França. A planta possui folhas largas, lobuladas, onduladas, espessas, glabras e cobertas por leve camada de cera, possuindo uma haste floral de 0,60m até 1,00m de altura, terminando com uma inflorescência de flores amarelas ou brancas dispostas em cruz, característica que deu nome à família (Cruciferae). Através de vários séculos de seleção natural chegou-se a uma espécie onde as folhas crescendo, imbricam-se reúnem-se formando uma cabeça mais ou menos compacta, envolvendo um broto central que passou a ser conhecida como couve-de-cabeça, couve-maçã ou simplesmente repolho (Murayama, 1983).

No século 14 a Holanda era o principal centro produtor de repolho, sendo que somente mais tarde esta hortaliça passou a ser cultivada em outros países da Europa. Recentemente espalhou-se pelo mundo tornando-se o vegetal, dentre as brássicas, mais cultivado em muitos países de clima temperado. Em países de clima tropical e subtropical é em geral cultivado durante a estação de inverno (Leike, 1988).

Em alguns países europeus e asiáticos o repolho é um dos vegetais mais importante na alimentação, podendo ser consumido cozido ou cru, como salada ou conserva, sendo ainda um ingrediente fundamental em alguns pratos típicos nacionais (Leike,1988). Além disto, esta hortaliça é rica em vitamina C, superando inclusive o tomate e a laranja, sendo de baixo valor energético, possuindo altos níveis de vitamina B₁ e B₂ além de sais de ferro e de cálcio (Arismendi, 1975).

A cultura do repolho é feita através de mudas que são normalmente produzidas em sementeiras e transplantadas diretamente para o campo, ou sementeiras-viveiros onde são levadas para o campo já com 6 a 8 folhas definitivas, permitindo que se faça uma seleção das mudas. O ciclo vegetativo desta cultura varia de 70 a 90 dias para as variedades precoces, 100 a 120 dias para as variedades de precocidade média e mais de 150 dias para as variedades tardias. Após o término da fase vegetativa inicia-se a fase reprodutiva com a emissão da haste floral, que rompe as folhas embricadas que formam a cabeça do repolho, expondo o pendão floral.

Há uma estreita relação entre cultivares e clima, podendo-se agrupar, conforme Filgueira (1982), as atuais cultivares exploradas de acordo com suas exigências climáticas em três grupos: a) repolhos de inverno, b) de verão e c) intermediário. No primeiro grupo estão aqueles que exigem temperaturas baixas, especialmente na formação da cabeça. À excessão das cultivares excessivamente tardias, podem ser cultivadas o ano todo em países de clima tropical. Em geral, no entanto, seu desempenho no verão não é satisfatória devido elevada incidência de doenças, especialmente a podridão negra causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Maluf e Corte, 1990). A grande maioria dos cultivares e híbridos de repolho cultivados no mundo, são classificados como de inverno.

No segundo grupo estão os repolhos de verão, que produzem boas cabeças sob temperaturas elevadas, mas que sofrem um pendoamento precoce quando expostos ao frio; estes materiais em geral são mais resistentes a podridão negra.

No terceiro grupo, estão as cultivares intermediárias que possuem uma capacidade relativamente boa para formação de cabeça no verão, e por exigir temperaturas mais baixas para o florescimento, podem ser adaptáveis a uma faixa de temperatura mais ampla (Filgueira, 1982).

O repolho em razão de sua antiguidade, ampla distribuição geográfica e facilidade de produção, é a hortaliça mais importante da família das crucíferas. Está entre as dez hortaliças de maior valor econômico no Brasil, e alcançou esta importância depois do desenvolvimento de variedades melhoradas, especialmente adaptadas ao cultivo de verão, para algumas regiões brasileiras (Ferreira, 1978).

Os objetivos dos programas de melhoramento do repolho são os de desenvolver linhagens e híbridos que apresentem boa formação de cabeça, alta produtividade, uniformidade da cultura, resistência a pragas e doenças e principalmente materiais adaptados ao cultivo para as condições climáticas brasileiras, com qualidade que possa ser competitivo com os materiais importados.

Dentre os vários desafios enfrentados pelos melhoristas para obtenção de materiais de alta qualidade está a identificação e seleção de linhagens e/ou clones auto-incompatíveis, capazes de gerar híbridos competitivos; estas linhagens ou clones, auto-incompatíveis, a menos que fossem homozigóticas para os alelos de auto-incompatibilidade, necessitariam de ser multiplicados de forma vegetativa. Mesmo no caso de homozigose, a propagação vegetativa poderia ser competitiva com a forma tradicional de manutenção das linhagens auto-incompatíveis, que é a polinização em botão (Maluf e Corte, 1990).

Normalmente a multiplicação vegetativa do repolho é feita através de estaquia, podendo estas estacas serem obtidas a partir de gemas axilares das folhas da cabeça formada do repolho. Para a maioria das linhagens e clones este procedimento pode ser suficiente para produzir um número de plantas adequadas para atender as necessidades do melhorista.

Porém, algumas linhagens e clones não apresentam a mesma facilidade em regenerar plantas a partir das estacas oriundas de gemas axilares. Estas linhagens, por fatores ainda desconhecidos, não apresentam gemas aparentes nas axilas das folhas que formam a cabeça do repolho, e mesmo quando colocadas em ambientes semelhantes ao das estacas das linhagens de fácil multiplicação, não emitem raízes, permanecendo inalteradas por algumas semanas e logo em seguida apodrecem e morrem (Maluf, observação pessoal).

Os clones utilizados neste trabalho foram, família clonal 007 que são grupos de clones endogâmicos e altamente relacionados entre si originários de uma mesma linhagem endogâmica proveniente do cruzamento original entre as cultivares 'Louco' e 'Bonshu'; auto-incompatíveis, e portadores do mesmo alelo para auto-incompatibilidade.

Família clonal 800 grupos de clones endogâmicos e altamente relacionados entre si originários de uma mesma linhagem endogâmica proveniente da cultivar 'louco'; auto-incompatíveis, e portadores do mesmo alelo para incompatibilidade, diferente do alelo presente na família clonal 007.

Clone 400 originário de uma planta identificada dentro do híbrido comercial 'Kenzan'; constitui presumivelmente, uma planta "sib" da linhagem maternal do híbrido, identificada por seu menor tamanho relativo às plantas do híbrido propriamente ditas.

Para superar as dificuldades de propagação apresentadas por algumas linhagens de grande interesse para o melhoramento pode-se utilizar das técnicas de cultura de tecidos. Este

trabalho teve por objetivo desenvolver uma metodologia de multiplicação para o repolho, seja através de indução de enraizamento das estacas *in vivo* ou por micropropagação *in vitro* com a utilização de reguladores de crescimento estimulando a organogênese nos tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARISMENDI, L.G. Efeito de métodos de produção de mudas e populações no rendimento do repolho (*Brassica oleracea* L. var. capitata). Viçosa: UFV. Imprensa Universitária, 1975. 50p (Dissertação- Mestrado em Fitotecnia)
- FERREIRA, M.C. Efeito de métodos de produção das mudas na produção comercial de repolho (*Brassica oleracea* L. var. capitata). Viçosa: UFV. Imprensa Universitária, 1978. 46p (Dissertação- Mestrado em Fitotecnia)
- FILGUEIRA, F.A.R. Manual de olericultura : Cultura e comercialização de hortaliças. São Paulo: Agronômica Ceres, 1982. v.2, p. 33-75.
- LEIKE, H. Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. Capitata). In: BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Berlin: Springer-Verlag, 1988. v.6, p.226-251.
- MALUF, W.R.; CORTE, R.D. Produções de semente de repolho. In: CASTELLANE, P.D.; NICLOSI, W.M.; HASEGAWA, M. Produção de sementes de hortaliças. São Paulo: FUNEP-SOB-UNESP, 1990. p.177-192.
- MURAYAMA, S. Horticultura. 2 ed. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, Campinas, 1983. 321p.

2 INDUÇÃO DE ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE REPOLHO *IN VIVO*

RESUMO

Alguns clones de repolho apresentam dificuldade para a propagação vegetativa, seja por falta de capacidade de enraizamento ou pela ausência de gemas nas axilas das folhas. Por isso, procurou-se através do uso de reguladores de crescimento, induzir o enraizamento de microestacas visando estimular o desenvolvimento das gemas laterais. As bases das microestacas das famílias clonais 007, (considerada de difícil enraizamento), e 800 (de fácil enraizamento, utilizada como testemunha) foram imersa em soluções de AIB nas concentrações de 0, 5, 25 e 125 mg/L suplementada com ácido bórico (100 mg/L) e sacarose (20 g/L) por um período de 15 horas. Em seguida foram colocadas em bandejas de isopor com 72 células contendo como substrato uma mistura de plantimax^R e casca de arroz carbonizada na proporção de 1:1, sendo uma microestaca por célula. O experimento foi instalado sob sombrite 70% em casa de vegetação com sistema de irrigação por nebulização intermitente por um período de 30 dias. Para a família clonal 007 o tratamento 125 mg/L de AIB foi o que apresentou o maior número de microestacas enraizadas e o maior número de raízes. No entanto, o comprimento das raízes foi menor em relação aos outros tratamentos, devido a concentração do AIB ser mais elevada e inibir o crescimento das raízes. Embora a família clonal 800 tenha apresentado o maior número de microestacas enraizadas no tratamentos 125 mg/L, este valor não foi muito diferente do que o

tratamento sem o AIB. Por isso por ser um clone de fácil enraizamento não se justifica a aplicação de AIB para induzir o enraizamento nesta família clonal.

2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

A capacidade que um caule tem para emitir raízes é uma característica variável, dependendo da espécie, com interação de fatores inerentes às células, como substâncias translocáveis, produzidas nas folhas e gemas, e do tratamento a que é submetido sob a influência do meio ambiente (Silva, 1984).

Um desses fatores é o substrato usado para o enraizamento, e que possui como funções básicas fornecer sustentação, umidade adequada e boa aeração as estacas, e deve ser livre de patógenos. Ele não só afeta a percentagem de estacas enraizadas como também a qualidade do sistema radicular formado (Jesus, 1994; Hartmann e Kester, 1975). Vários tipos de substratos podem ser utilizados na propagação de plantas, não necessitando, porém, de fornecerem nutrientes até que o sistema radicular seja estabelecido. Desta forma, misturas contendo solo, areia e vermiculita são amplamente empregadas com bons resultados (Jesus, 1994).

A umidade do ambiente exerce uma grande influência no enraizamento de estacas e constitui-se num importante fator para a propagação vegetativa (Jesus, 1994; Stoltz, 1968). Segundo Hartmann e Kester (1975), a nebulização, mantém a umidade do ar elevada, reduz a temperatura do ar e da estaca, diminuindo a transpiração e, conseqüentemente, a desidratação dos tecidos, mantendo as estacas vivas até a formação das raízes.

Na propagação de clones de ameixeira através de estacas, Kersten (1990), verificou que o tempo para a emissão de raízes foi diferente para os diferentes clones, e que a velocidade na

emissão de raízes é tido como consequência da temperatura na região do substrato próximo a base da estaca ou da concentração do regulador de crescimento utilizado.

Kersten e Fachinello (1981) trabalhando com dois tipos de estacas herbáceas (com e sem meristema apical) de ramos de figueira (*Ficus carica* L.), concluíram que a presença da gema apical na estaca, dispensa a utilização de reguladores de crescimento vegetal para o enraizamento das mesmas. Entre os fatores endógenos, foi verificado que folhas deficientes em boro apresentavam comparativamente maiores concentrações de açúcar e amido; contudo, a concentração de açúcar nos ramos é baixa, indicando que a deficiência de boro prejudica a translocação de açúcar das folhas para os ramos (Kersten, 1990; Gauch e Dugger, 1953). Comparando soluções nutritivas com sacarose e boro, isolados ou em misturas, Gauch e Dugger (1953) observaram uma estreita dependência da presença de boro para a translocação do açúcar.

Em camélia a utilização conjunta de AIB e boro melhorou o desenvolvimento de raízes quando comparado a aplicação de cada um isoladamente segundo Ono, Rodrigues e Rodrigues (1992). Este efeito benéfico do boro no enraizamento, segundo Lewis (1980), citado por Deschamps (1993), é devido ao controle da permeabilidade da membrana no transporte de açúcares e de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, fenóis, ligninas, auxinas e ácidos nucléicos. De acordo com Kersten (1990) e Weiser e Blaney (1967) o boro não tem efeito na emissão de raízes, porém é essencial para o seu desenvolvimento. Gauch e Dugger (1953) encontraram deficiência de carboidratos nos meristemas de raízes de plantas deficientes de boro.

No enraizamento de estacas caulinares foliadas, os produtos da fotossíntese são importantes na iniciação e crescimento das raízes, enquanto nas sem folhas, o enraizamento depende do teor de carboidratos acumulados nos tecidos das estacas (Hartmann, 1976). Stoltz (1968) em trabalhos com estacas das cultivares de crisântemo 'Mrs Roy' considerada de difícil

enraizamento e 'Bright Golden Anne', de fácil enraizamento, constatou a relação entre o conteúdo de carboidrato e a formação de raízes, salientando que a baixa capacidade de enraizamento da cultivar 'Mrs Roy', seria devido ao baixo teor de carboidratos. Doud e Carlson (1977) trabalhando com porta enxerto de macieira estiolado, correlacionaram a maior capacidade de enraizamento com o acúmulo de amido próximo a gema.

A substância mais utilizada para o enraizamento de estacas atualmente é o AIB, que apesar de apresentar um atividade auxínica mais fraca que o ANA, degrada lentamente na planta, ao passo que o ANA se decompõe mais facilmente. Esses compostos químicos não só aceleram a cicatrização do corte e a emissão de raízes como também favorecem o aumento do número e comprimento destas raízes (Jesus, 1994; Rubbo, 1989 e Silva, 1984). Chauhan e Reddy citados por Kersten (1990) trataram estacas de ramos de ameixeira da cultivar Santa Rosa, com AIB e ANA (aplicados isolados ou em mistura, em igual proporção) em condições de nebulização, e concluíram que o AIB foi melhor que o ANA, com maior percentagem de estacas enraizadas. Segundo Andreassen e Ellison (1967) o enraizamento de estacas de aspargos pode ser induzido tanto por ANA como AIB. No entanto, eles alertam que há possibilidade de ocorrerem respostas variadas entre os clones. Innecco (1993) observou que microestacas basais de pimentão coletadas a partir de plantas com diâmetro entre 3 e 5 mm tiveram um bom enraizamento quando colocadas em solução de AIB (15 mg/L) por um período de 3 horas.

2.2 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo a indução de enraizamento de microestacas de repolho através de aplicação de AIB, e verificação de sua influência no desenvolvimento de

brotações laterais de clones de difícil propagação. Ênfase foi dada a família clonal 007, que constitui material de difícil propagação vegetativa, em virtude da ausência de gemas axilares aparentes na base de muitas folhas constituintes da cabeça.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

A indução de enraizamento foi realizada em microestacas da família clonal 007, considerada de difícil enraizamento, e da família clonal 800, de fácil enraizamento, coletadas a partir de cabeças de repolho desenvolvidas (1,5 a 2,0 Kg) cultivadas no campo na estação experimental no município de Ijaci - MG. As microestacas formadas pela nervura central das folhas, com tamanho aproximado de 6 cm de comprimento, mais uma pequena parte do caule, aproveitando a axila foliar onde se encontra a gema lateral.

Após a preparação de todas as microestacas, foi realizado um ensaio preliminar onde as microestacas foram separadas em grupos homogêneos, quanto ao tamanho, e submetidas aos tratamentos de imersão da base das estacas por um período de 1 hora em soluções de 0, 5, 25, 125 e 625 mg/L de AIB mais um tratamento adicional composto de 25 mg/L de AIB, suplementado com 100 mg/L de ácido bórico e 20 g/L de sacarose. Em seguida, foram colocadas em bandejas de isopor com 72 células contendo como substrato uma mistura de Plantimax^R e casca de arroz carbonizada na proporção de 1:1 (Figura 01), sendo colocado uma microestaca por célula. Este ensaio foi instalado em casa de vegetação, sobre uma bancada de alvenaria, coberto com sombrite (70%) de modo a reduzir a incidência de luminosidade sobre as microestacas, com sistema de irrigação por nebulização intermitente, por um período de 30 dias. Para cada tratamento foram utilizadas 40 microestacas, sendo avaliado o número de estacas brotadas após o



FIGURA 01 - Amostra do experimento de enraizamento de estacas mostrando as microestacas em bandejas de isopor contendo como substrato uma mistura de casca de arroz carbonizada e Plantimax^R.

período da instalação. Após a contagem das brotações, estas foram transferidas para vasos de plástico de 2 litros e depois de 2 meses levadas para o campo para produção de novos materiais.

A partir dos resultados obtidos neste ensaio preliminar, foi conduzido um experimento com os seguintes tratamentos 0, 5, 25 e 125 mg/L de AIB com adição de 100 mg/L de ácido bórico e 20 g/L de sacarose em todos os tratamentos para as famílias clonais 800 e 007. O local de instalação foi o mesmo descrito anteriormente. O tempo de imersão das microestacas nas soluções de AIB foi de 15 horas.

Neste experimento foram utilizadas 20 microestacas iniciais por cada tratamento. A avaliação foi realizada 30 dias após a instalação do experimento, medindo-se o desenvolvimento do sistema radicular através do número de estacas enraizadas, número e comprimento médio de raiz.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio preliminar os tratamentos com AIB promoveram um aumento na porcentagem de brotações das microestacas em relação à testemunha sem AIB (Figura 02)

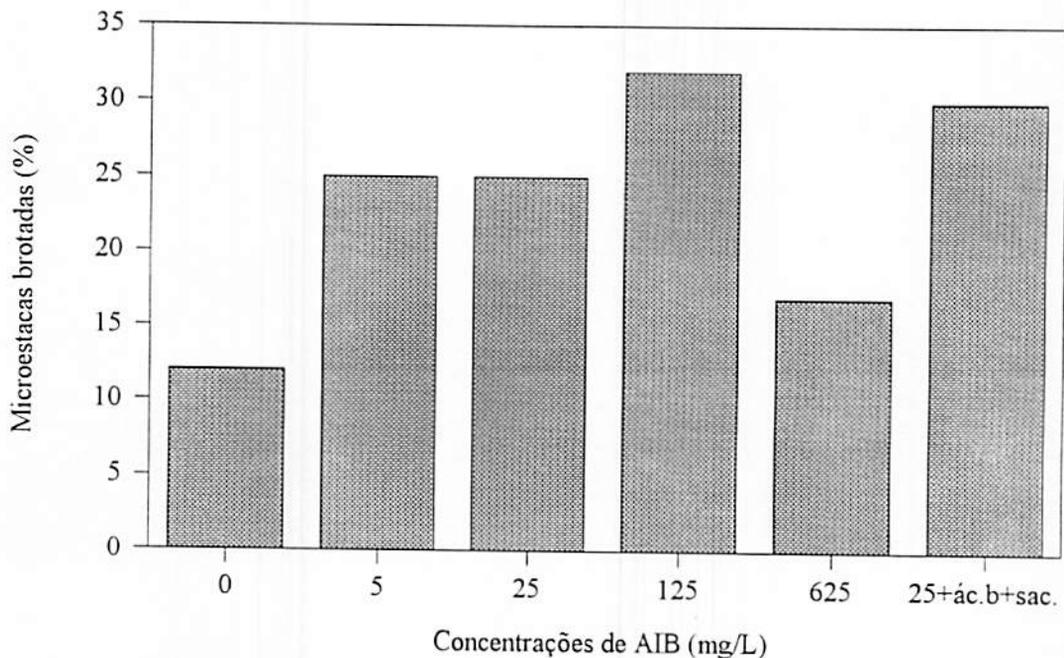


FIGURA 02 - Representação gráfica das porcentagens de brotações da família clonal 007, em função das diferentes concentrações de AIB e do tratamento adicional de AIB + ácido bórico + sacarose.

Estes resultados mostram que o maior número de microestacas brotadas foram obtidas com 125 mg/L de AIB e 25 mg/L de AIB + ácido bórico + sacarose. O tratamento com ácido bórico e sacarose promoveu um maior número de microestacas brotadas e o sistema radicular destas microestacas também foi mais desenvolvido de que o tratamento com a mesma concentração de AIB sem adição destes compostos. Estes resultados estão de acordo com Deschamps (1993), Ono, Rodrigues e Rodrigues (1992), Kersten (1990), e Gauch e Dugger (1953), que relataram que embora o ácido bórico e a sacarose não induzam a formação de raiz, eles exercem uma influência muito grande no seu desenvolvimento.

Entre os tratamentos 5 mg/L e 25 mg/L não houve diferença no número de microestacas brotadas. A concentração de 625 mg/L de AIB foi excessivamente elevada, causando uma diminuição no número de microestacas brotada; esta dosagem pode ter causado um desbalanço interno de auxinas e citocininas inibindo a formação do sistema radicular e consequentemente diminuindo a capacidade de brotações das microestacas.

No segundo ensaio procurou-se avaliar o desenvolvimento do sistema radicular, medindo o número e comprimento de raiz das microestacas das famílias clonais 007 e 800. Os resultados podem ser visto no Quadro 01.

A família clonal 800, por ser de fácil enraizamento, quase não apresentou variação entre os tratamentos com e sem AIB. No entanto, a família clonal 007 teve uma resposta bastante significativa entre os tratamentos com aplicação de AIB em relação ao tratamento sem AIB. Os resultados apresentados neste trabalho mostram que os clones de difícil enraizamento necessitam de um estímulo externo para induzir o enraizamento. Isto talvez seja devido a um desbalanço hormonal nestas microestacas ou a presença de substâncias inibidoras do enraizamento em maiores concentrações.

QUADRO 01 - Número de microestacas enraizadas e número de raízes totais das famílias clonais 007 e 800, em cinco concentrações de AIB suplementado com ácido bórico (100 mg/L) e sacarose (20 g/L).

Tratamento	mg/L de AIB + ácido bórico e sacarose	Nº de estacas enraizadas famílias clonais		Nº de raiz por tratamento famílias clonais	
		007	800	007	800
1	0	6	14	31	98
2	5	15	15	101	120
3	25	15	15	99	113
4	125	14	16	125	140

O tratamento sem AIB, apenas com ácido bórico e sacarose, apresentou poucas microestacas enraizadas e baixo número de raízes por microestaca em relação aos outros tratamentos. Estes resultados estão de acordo aos de Deschamps (1993) e Weiser e Blaney (1967) que relataram que o boro sozinho não tem efeito na indução de enraizamento.

As concentrações de 5 e 25 mg/L tiveram o mesmo comportamento, como já havia sido observado no primeiro ensaio, mesmo aumentando o tempo de imersão. O maior número de raízes para a família clonal 007 foi observado com 125 mg/L de AIB mais ácido bórico e sacarose, conforme pode-se ver na Figura 03.

Com relação ao tamanho das raízes o resultado foi inverso ao do número de raízes, ou seja, o tratamento sem AIB promoveu um crescimento maior das raízes, enquanto, concentrações mais elevadas de auxina inibiu o desenvolvimento do sistema radicular (Figura 04), para a família clonal 007. Estes resultados concordam com os de Jesus (1994), Rubbo (1989) e Silva (1984) confirmando que o AIB pode ser usado na indução de um sistema radicular mais desenvolvido, embora em concentrações mais elevadas provoque uma redução no crescimento das raízes individuais.

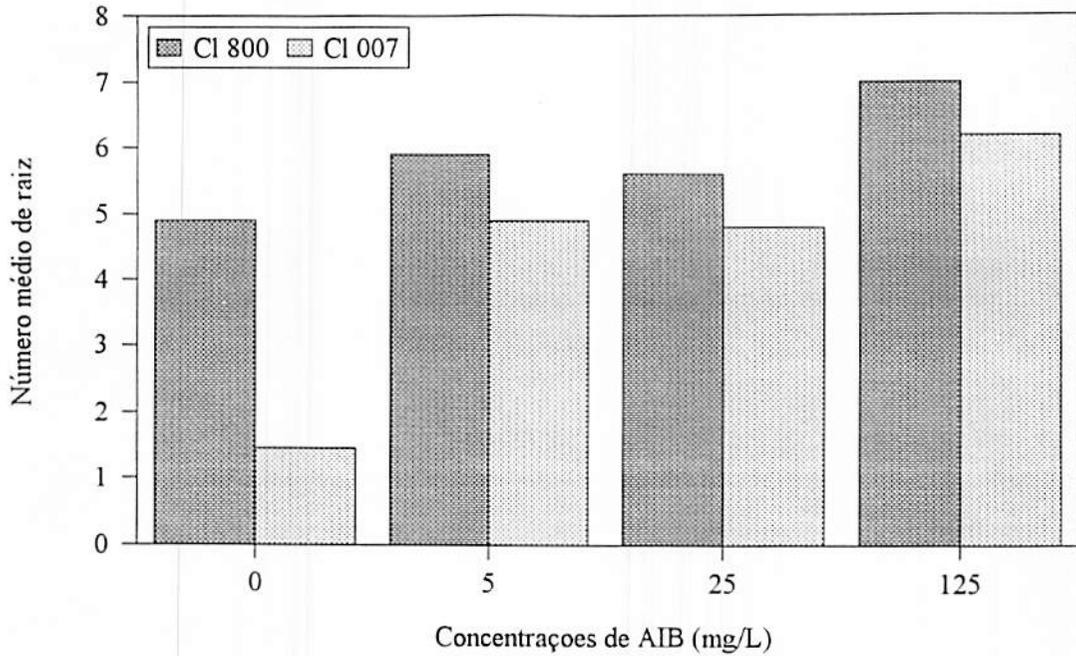


FIGURA 03 - Representação gráfica do número médio de raízes, em função de diferentes concentrações de AIB para as famílias clonais 007 e 800.

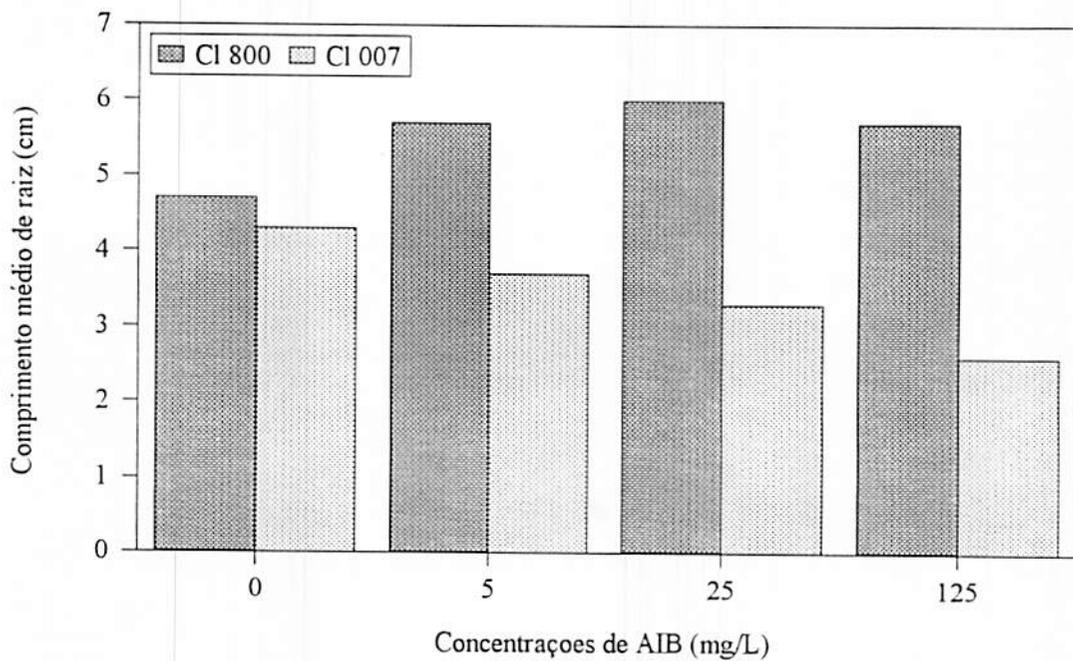


FIGURA 04 - Representação gráfica do comprimento médio de raízes, em função de diferentes concentrações de AIB para as famílias clonais 007 e 800.

Foi observado também, que microestacas de repolho da família clonal 007 com presença da gema lateral conspícua não chegam a dispensar o tratamento com AIB, mas o desenvolvimento destes brotos ocorrem com maior facilidade. Ao contrário do que observou Kersten e Fachinello (1981) na propagação de ramos herbáceos de figueira que dispensam o tratamento com AIB quando se observa a presença de gema lateral nos ramos.

2.5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que o tratamento 125 mg/L de AIB mais 100 mg/L de ácido bórico e 20 g/L de sacarose foi o mais adequado para indução de um sistema radicular para a família clonal 007. Para a família clonal 800 a aplicação de AIB não apresentou nenhuma diferença significativa entre os tratamentos quanto a indução de enraizamento, devido este ser um material de fácil enraizamento *in vivo* não necessitando porém de estímulo externo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREASSEN, D.C.; ELLISON, J.H. Root initiation of stem tip cuttings from mature asparagus plants, *Proceeding American Society for Horticultural Science*, College Park, v.90, p.158-162, 1967.
- DESCHAMPS, C. Propagação vegetativa *in vitro* e *in vivo* de sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.), espécie florestal de mata ciliar. Lavras: ESAL, 1993. 128p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- DOUD, S.L.; CARLSON, R.F. Effects of etiolation, stem anatomy and starch reserves on root initiation of layred malus clones. *Journal of American Society for Horticultural Science*, Saint Joseph, v.102, n.4, p.487-491, 1977.
- GAUCH, H.G.; DUGGER Jr, W.M. The role of boron in the translocation of sucrose. *Plant Physiology*, Rockville, v.28, p.457-466, 1953.

- HARTMANN, H.T. **Propagation de plantas: princípios y practica.** México: Editorial Continental, 1976. 810 p.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Plant Propagation principles and practices** 3th. Ed. New Jersey: Englewood Cliffs, 1975. 662p.
- INNECCO, R. **Propagação vegetativa de pimentão *Capsicum annuum* L. através de métodos *in vitro* e estacas.** Lavras: ESAL, 1993. 105p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- JESUS, A.M.S. **Obtenção antecipada de mudas de videira (*Vitis* spp)** Lavras: ESAL, 1994. 75p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- KERSTEN, E. **Efeito de Boro, Zinco e Ácido Indol Butirico (AIB) no enraizamento de estacas de dois cultivares de Ameixeira (*Prunus salicina*, Lindl.)** Piracicaba: ESALQ, 1990 109p (Tese - Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas).
- KERSTEN, E.; FACHINELLO, J.C. **Efeito de Ácido Indol Butirico (AIB) na percentagem de estacas enraizadas de figueira (*Ficus carica* L.) cultivar Roxo de Valinhos em condições de nebulização.** *Agros, Pelotas*, v.16 n.3/4, p.5-10, 1981.
- ONO, E.O.; RODRIGUES, J.O.; RODRIGUES, S.D. **Interação entre auxinas e boro no enraizamento de estacas de Camélia.** *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, São Carlos, v.4, n.2, p.107-112, 1992.
- RUBBO, M.S. **Estudo de enraizamento de estacas de caqui (*Dyospirus kaki* L.)** Piracicaba: ESALQ, 1989. 90p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- SILVA, A.L. **Influência de Ácido Indol Butirico (AIB) na obtenção de mudas enxertadas de videira (*Vitis* spp) em um ciclo vegetativo.** Pelotas: UFPel, 1984. 51p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- STOLTZ, L.P. **Factors Influencing Root Initiation in an Easy-and a Difficult-to-Root Chrysanthemum.** *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, College Park, v.92, p.622-626, 1968.
- WEISER, C.J.; BLANEY, L.T. **The Nature of Boron Stimulation to Root Initiation and Development in Beans.** *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, College Park, v.90, p.191-200, 1967.

3 EFEITO DE DIFERENTES CITOCININAS NA INDUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE BROTOS ADVENTÍCIOS DE SEGMENTOS NODAIS DE REPOLHO *IN VITRO*

RESUMO

Indução e desenvolvimento de segmentos nodais de repolho foram avaliados em função de três tipos de citocininas (BAP, Kin e TDZ) e variações nos níveis de TDZ. Os explantes secundários tinham 2,5 cm de comprimento (4 a 5 gemas), obtidas do cultivo *in vitro* a partir de gemas laterais de cabeça de repolho do clone 400 e da família clonal 007 cultivadas no campo. O meio de cultura utilizado foi o MS modificado pela adição de 27 mg/L de adenina, 5 mg/L de AIA; 161,5 mg/L de NaH₂PO₄.H₂O e suplementado com 18,5 µM de Cinetina, ou 17,7 µM de BAP ou 0,45 µM de TDZ. No segundo experimento utilizou-se o MS modificado suplementado com 0,0 ; 0,03; 0,3; 3,0 mg/L de TDZ. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os experimentos foram instalados em sala de crescimento com 16/8 horas de luz/escuro, 28 ± 1° C e 2500 lux, sendo composto de 4 repetições com 3 frascos e 2 estacas por frasco em cada tratamento. A avaliação feita aos 30 dias após a repicagem não mostrou nenhuma diferença significativa entre as citocininas para número de brotos. Entretanto, a Kin apresentou um comprimento médio dos brotos maior que o obtido com o BAP. O TDZ teve um comportamento intermediário entre o Kin e BAP

Para a avaliação dos níveis de TDZ feita aos 45 dias após a repicagem, observou que o número de brotos foi maior nas concentrações de 0,3 e 3,0 mg/L, embora o comprimento

médio dos brotos tenha sido significativamente menor em relação a testemunha. Os pesos de matéria fresca e seca apresentaram maiores valores para os tratamentos onde foi aplicado o TDZ. Os resultados obtidos no primeiro experimento com as dosagens 0,3 e 3,0 mg/L foram semelhantes para todos os parâmetros avaliados. Os brotos produzidos nos tratamentos com TDZ, apesar do tamanho reduzido foram capazes de desenvolver normalmente quando transferidos para meio de cultura livre de reguladores de crescimento.

3.1 REFERENCIAL TEÓRICO

O gênero *Brassica* abrange um grande número de espécies, consideradas importantes em todas as partes do mundo (Leike, 1988). Tais espécies incluem hortaliças, forrageiras, e plantas usadas como adubação verde, condimentos e cujas sementes são produtoras de óleo (Giordano, 1983).

Devido a esta importância os melhoristas têm procurado desenvolver híbridos de alta qualidade e produtividade que atendam as necessidades do mercado. Portanto, o estabelecimento de uma metodologia de multiplicação rápida de clones selecionados seria bastante útil para auxiliar os programas de melhoramento. Um dos métodos de multiplicação mais utilizado atualmente é a micropropagação através da cultura de tecidos, onde se utilizam vários explantes diferentes como segmentos de raiz (Lazzeri e Dunweell, 1984; Bajaj e Nietsch, 1975), hipocótilo e cotiledone (Innecco, 1993; Paek, Chandler e Thorpe, 1987; Bajaj e Nietsch, 1975), brotos axilares (Nieuwkerk, Zimmerman e Fordham, 1986), entre outros, para regenerar plantas sadias em curto espaço de tempo.

A cultura de tecidos também é utilizada para propagar plantas selecionadas cuja manutenção por métodos convencionais é bastante trabalhosa: plantas macho esteréis, auto-incompatíveis e linhagens mantenedoras que são materiais de grande importância nos programas de melhoramentos.

A maior parte dos trabalhos realizados tentando desenvolver uma metodologia de propagação *in vitro* para o gênero *Brassica* se concentra principalmente nas espécies *B. napus* e *B. campestris* (Leike, 1988), cujas as sementes são utilizadas na fabricação de óleos comestíveis (Giordano, 1983), e entre as *Brassicaceae* as variedades botânicas brócolo e couve-flor (Leike, 1988).

A determinação de um processo de multiplicação *in vitro* tem sido dificultada devido a grande variabilidade entre as cultivares dentro de *Brassica oleracea*, superando até mesmo a variabilidade entre as várias espécies de *Brassica* (Dietert, Barron e Yoder, 1982). Esta dificuldade também foi relatada por Deng, Heap e Klein (1991) Paek, Chandler e Thorpe, (1987) e Dunwell (1981) tentando propagar *B. campestris in vitro*.

Paek, Chandler e Thorpe (1987) utilizaram mais de 2800 segmentos de hipocótilo e cotilédones de *B. campestris* em 92 meios de cultura diferentes, variando as concentrações de sacarose ou adicionando sulfato de adenina, fosfato de sódio ou tirosina, mas não obtiveram sucesso na indução de brotos, pois apenas um explante produziu um broto adventício.

Segundo Deng, Heap e Klein (1991); Paek, Chandler e Thorpe (1987) e Kuo e Tsay (1977), a aplicação de citocinina no meio de cultura é fundamental para se obter a indução de brotações nos segmentos de hipocótilo e cotilédone de *B. campestris* e em outras espécies de *Brassicaceae*.

A adição de fitorreguladores ao meio de cultura visa principalmente suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz, estimulando certa resposta na planta como crescimento e alongamento ou multiplicação da parte aérea e da raiz (Grattapaglia e Machado, 1990).

As auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação destas duas classes de reguladores de crescimento (Skoog e Miller, 1957) citado por Caldas, Haridasan e Ferreira (1990).

As auxinas, como o AIA, AIB e 2,4-D entre outras apresentam respostas diferentes *in vitro*. O AIA é considerado uma auxina instável, que se degrada facilmente pela ação da luz ou pela atividade microbiana que a transforma em triptofano. Esta instabilidade aliada a sua inativação ou destruição metabólica na célula, à torna uma auxina relativamente fraca quando comparada ao 2,4-D, por exemplo (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990). Contudo, a presença de AIA tem sido benéfica no isolamento de segmentos nodais de *Eucalyptus* e meristemas florais de couve-flor (Grattapaglia e Machado, 1990).

O 2,4-D tende a estimular a formação de calo mesmo em baixas concentrações, enquanto o AIB é uma auxina muito eficaz para indução de enraizamento (Grattapaglia e Machado, 1990).

Dentre as citocininas comercialmente disponíveis, o BAP ou BA é a que, em geral, apresenta melhores resultados induzindo a formação de grande número de brotos e altas taxas de multiplicação, enquanto a Kin e 2iP permitem apenas o crescimento normal sem brotações múltiplas (Hu e Wang, 1983).

1 dia 6,00
2 dias 2,28
3 dias 2,28



As concentrações de citocininas podem variar bastante em função da espécie e do tipo de explante. Concentrações da ordem de décimos de miligramas são mais comuns no cultivo de ápices caulinares, enquanto que segmentos nodais e ápices inteiros são submetidos a concentrações maiores. Meios de cultura com 0,05 a 1,0 mg/L de BAP tem sido utilizados com bons resultados para o cultivo de ápices caulinares de várias espécies herbáceas e lenhosas (Grattapaglia e Machado, 1990).

A propagação vegetativa *in vitro* de repolho iniciou segundo Leike (1988) com Bajaj e Nietsch (1975) e Primo-Millo e Harada (1975) com o propósito de investigar a capacidade de vários explantes em regenerar órgãos e plantas.

Bajaj e Nietsch (1975), observaram que em segmentos de raiz cultivados em meio MS ocorriam algumas protuberâncias brancas que após algumas semanas de cultivo aumentavam e formavam brotos. Quando o meio MS foi suplementado com AIA, houve um pequeno estímulo no desenvolvimento de raízes laterais mas não houve efeito perceptível no desenvolvimento de brotos. Com adição de Kin ou água de coco foi verificado um aumento na capacidade regenerativa das raízes e também no número de brotos. Para os segmentos de hipocótilo em meio MS ocorriam sinais de desenvolvimento dentro de 2 dias de cultivo, porém houve um aumento considerável quando AIA foi adicionado ao meio de cultivo. Suplementando o meio MS com 2,4-D, Kin e água de coco houve uma proliferação de calos em todos os segmentos. Entretanto, a substituição de 2,4-D por Kin suprimiu o desenvolvimento de calos e promoveu a formação de brotos na superfície dos segmentos após 6 semanas de cultivo. Os cotilédones e os segmentos de folhas quando cultivados em meio MS aumentaram de tamanho atingindo até 10 vezes o seu tamanho inicial. A adição de AIA, água de coco ou caseína hidrolizada promoveu a regeneração de folhas

dentro de 5 semanas ou a proliferação de calo compacto e de crescimento lento na base da estaca, enquanto no meio de cultura com AIA e Kin foi observada uma abundância de brotos.

Segundo Nanda Kumar e Shivanna (1991) a multiplicação *in vitro* de híbridos interespecíficos de *B. fruticulosa* e *B. campestris* através de gemas e segmentos nodais foi obtida em meio de cultura contendo BAP. A base das estacas exibiram um pequeno entumescimento, a cerca de uma semana de cultivo, seguido por uma proliferação gradual de brotos. Altas concentrações de BAP produziram maior quantidade de brotos, porém estes tenderam a algumas anormalidades morfológicas como crescimento atrofiado e folhas estreitas. O meio contendo 2,2 mM de BAP foi o que apresentou melhor resultado para multiplicação e crescimento dos brotos. Os explantes cultivados em meio sem BAP apresentaram alongamento, mas não produziram nenhum broto adicional.

Kuo e Tsay (1977) trabalhando na propagação de *B. campestris* através de brotos axilares, verificaram que, a adição de BAP ao meio MS foi melhor que a Kin para o crescimento e desenvolvimento de brotos. Resultados, semelhantes foram obtidos por Lazzeri e Dunwell (1986) na regeneração de brotos de *B. oleracea* var. *italica*, Plenck cv. *greem comet* utilizando discos de cotilédones, discos de folhas primárias e segmentos de hipócotilo. Entretanto, a regeneração de brotos através de segmentos de raiz em *B. oleracea* e *B. napus* em meio contendo Kin apresentou percentagem maior de brotos em relação ao BAP e Zeatina (Lazzeri e Dunwell, 1986).

Já Yang, Jia e Pua (1991) relataram que apesar da regeneração de brotos de hipocótilo de *B. carinata* ter apresentado a mesma frequência de brotações tanto para a combinação de BAP e ANA como para a combinação de Kin e 2,4-D, os brotos regenerados a partir de Kin e 2,4-D mostraram ser mais vigorosos.

Outra substância que está sendo atualmente utilizada em trabalhos de cultura de tecidos é o TDZ. Este produto descoberto pela Schering AG para ser usado como desfolhante na cultura do algodão (Lu, 1993, Mok et al., 1987; Fellman, Read e Hosier, 1987) tem mostrado efeitos semelhantes aos das citocininas quando aplicado em concentrações muito reduzida. Acredita-se que o TDZ induza a abscisão foliar por promover um aumento na produção endógena de etileno (Suttle, 1985). O TDZ é um composto do grupo das feniluréias (Nieuwkerk, Zimmerman e Fordham, 1986) e não apresenta o anel purina comum às citocininas tipo adenina, tais como, a benzilaminopurina, cinetina ou zeatina (Lu, 1993), mas apresenta propriedades similares, promovendo o crescimento de calos e induzindo organogêneses (Mok et al., 1987).

O mecanismo pelo qual o TDZ induz respostas semelhantes aos das citocininas não está ainda completamente entendido (Lu, 1993). Uma hipótese é a de que o TDZ promova a conversão de citocininas ribonucleotídeas em ribonucleosídeas biologicamente mais ativas (Capelle et al., 1983). A outra é a de que as citocininas do grupo das feniluréias tenderiam a aumentar a citocinina autônoma dos tecidos, devido a capacidade do TDZ em estimular a biossíntese das citocininas endógenas ou alterar seu metabolismo (Mok et al., 1987).

Altas concentrações de citocininas tipo adenina são frequentemente adotadas para o crescimento e diferenciação na cultura de tecidos. As citocininas sintéticas, tal como a cinetina e BAP, são menos susceptíveis a degradação enzimática pelas, (citocininas oxidases), mas são, geralmente, menos ativa do que as citocininas de ocorrência natural como a Zeatina e I⁶ Ade (Mok et al., 1987).

TDZ e 4PU-30 são resistentes à degradação pela citocinina oxidase (Mok et al., 1987), sendo portanto, mais estáveis e ativas biologicamente na cultura de tecidos, do que o

BAP ou Zeatina, e assim podem ser utilizadas, em baixas concentrações principalmente na micropropagação (Mok et al., 1987; Lu, 1993).

A atividade citocinínica do TDZ foi relatada primeiramente na cultura de calos de *Phaseolus lunatus* L. Kingston, onde ele se mostrou mais ativo que a zeatina (Mok, Mok, Armstrong, 1982).

Foi observado que na multiplicação de *Helicônia* sp, a concentração de 0,25 mg/L foi a que permitiu o maior número de brotos. Entretanto, o maior comprimento foi obtido em concentrações mais baixas (0,025 mg/L). O desenvolvimento dos brotos foi bastante afetado quando elevou a concentração de TDZ de 0,5 para 1,0 mg/L, obtendo-se um tamanho reduzido e folhas pequenas (Carvalho e Pinto, 1993).

Segundo Sato (1994) o maior número de brotos por explante obtido com gérbera de vaso (*Gerbera* sp) foi com 0,05 mg/L de TDZ. Em concentrações mais elevadas (4 mg/L) ocorreu uma inibição da regeneração de brotos e uma indução na formação de calo. Além disso, os maiores valores de peso de matéria fresca e matéria seca foram verificados nas dosagens de 0,5 e 2,0 mg/L de TDZ, sendo que, a partir de 0,5 mg/L foi devido a presença de entumescimento na base dos segmentos.

O TDZ tem sido empregado com muito sucesso na indução de brotos em várias espécies inclusive lenhosas (Fellman, Read e Hosier, 1987; Kerns e Meyer 1986).

A concentração ótima para proliferação de brotos do híbrido entre *Acer* x *Freemantii* encontrada por Kerns e Meyer, (1986), está entre 0,05 e 0,01 mM de TDZ, e que concentrações acima de 0,1 mM induziram a formação de calos no explante tanto na ausência como na presença de BAP.

O TDZ estimulou a proliferação de brotos de maçã 'Gala' (*Malus domestica* Borkh) quando incorporado ao meio de cultura Linsmaier e Skoog (1965) (LS) nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10 μM , sendo equivalente ou superior à adição de 4,4 mM de BAP (Nieuwkek, Zimmerman e Fordham, 1986). Em cormo de *Ixia flexuosa* o TDZ também induziu a formação de brotos adventícios em meio MS, embora menos vigorosos do que aqueles produzidos em meio com BAP (Meyer e Stadem, 1988).

A atividade biológica do TDZ na concentração de 0,3 mM foi considerada melhor do que I⁶ Ade a 10 mM na multiplicação de brotos de brócolo (Mok et al., 1987).

Na maioria dos casos, o TDZ tem apresentado resultados superiores em relação as outras citocininas na indução e multiplicação de brotos de várias espécies. Porém algumas anormalidades tem sido associadas ao uso do TDZ *in vitro* (Lu,1993) como hiperhidricidade (Debergh et al., 1992), brotos menores e menos vigorosos (Meyer e Staden, 1988; Nieuwkek, Zimmerman e Fordham, 1986), entufamento excessivo, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento excessivo dos caules e dificuldade de enraizamento (Lu,1993).

3.2 OBJETIVOS

O primeiro trabalho teve como objetivo comparar a atividade de três citocininas (Kin, BAP e TDZ) quando adicionadas ao meio de cultura MS modificado, para promover a indução e multiplicação de brotos de repolho (*Brassica oleracea* L. var. capitata) através de segmentos nodais. O segundo experimento teve como objetivo determinar a concentração mais adequada de TDZ na indução de brotos adventícios.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Estabelecimento da cultura *in vitro*

3.3.1.1 Coleta do material

As gemas axilares foram obtidas a partir de cabeças de repolho, apresentando em média 1,5 a 2,0 Kg, cultivadas no campo, na estação experimental de Ijaci, Estado de Minas Gerais.

A coleta foi realizada através do corte do caule da planta na parte basal da cabeça do repolho. Em seguida, as folhas externas sujas e danificadas, que ficavam em contato com o solo foram eliminadas. As cabeças foram trazidas para o laboratório, onde se destacou folha por folha para retirada das gemas que havia na axila de cada folha.

As gemas selecionadas foram em seguida preparadas para o cultivo *in vitro*.

3.3.1.2 Desinfestação das gemas

As gemas foram mantidas por 12 horas em água corrente, iniciando o tratamento de desinfestação dos explantes. A seguir, o material foi levado para a câmara de fluxo laminar e submetido a lavagem por 1 minuto em água com detergente (2 gotas/100 ml), 30 segundos em álcool 75%, e 10 minutos em hipoclorito de sódio (2%) acrescentado de tween 20 (2 gotas/100 ml), sendo enxaguado 4 vezes após cada etapa em água destilada e autoclavada.

3.3.1.3 Inoculação

As gemas foram introduzidas no meio de cultura em câmara de fluxo laminar com auxílio de uma pinça e um bisturi, bem afiado, para remoção das folhas externas que poderiam apresentar resíduos dos produtos químicos utilizados para desinfestação. Cada gema foi colocada em um tubo de ensaio (25 x 150mm) contendo 15 ml de meio de cultura Murashige e Skoog (1962) (MS) pH $5,8 \pm 1$ solidificado com 0,7% de ágar, previamente autoclavado a $121 \pm 1^{\circ}$ C por 20 minutos. Cada tubo foi fechado com tampa plástica e seus bordos protegidos com vitafilm[®]. Após a inoculação, os tubos foram mantidos por 15 dias em ambiente escuro para estimular o início de desenvolvimento das gemas, sendo em seguida transferidos para sala de crescimento com temperatura controlada de $26 \pm 1^{\circ}$ C, fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro com 2500 lux fornecida por lâmpadas fluorescentes branca fria. Após o desenvolvimento das gemas, quando os brotos atingiram entre 4 e 6 cm de comprimento, foram transferidos para frascos de 250 ml de capacidade contendo 30 ml de meio de cultura para multiplicação constituído de meio MS, suplementado com 27 mg/L de adenina, 161,5 mg/L de fosfato monobásico de sódio, 5 mg/L de Ácido Indol Acético (AIA) e 4 mg/L de Cinetina (Kin) solidificado com 07% de ágar e pH ajustado para 5,8.

A multiplicação do repolho foi conduzida através de repicagem dos brotos apicais ou segmentos nodais de 4 a 5 gemas axilares (2,5 cm) a cada período entre 40 e 60 dias da repicagem anterior, sendo colocados de 2 a 4 explantes por frasco.

3.3.2 Fase de multiplicação

Os explantes utilizados foram microestacas do clone 400 e família clonal 007, obtidas do cultivo *in vitro* conforme descrito no item 1. Para testar diferentes citocininas (BAP, Kin e TDZ) utilizou-se o clone 400 por ser de rápido crescimento, o que contribuiu para uma melhor avaliação do desenvolvimento dos explantes entre os tratamentos. Para testar diferentes níveis do TDZ utilizou-se a família clonal 007, devido ao TDZ ter apresentado melhor resultado entre as citocininas utilizadas e cujo objetivo principal deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de propagação para estes clones.

A repicagem foi realizada em câmara de fluxo laminar sob condições assépticas de modo a evitar a contaminação do material.

As plantas foram seccionadas em segmentos de 2,5 cm de comprimento com 4 a 5 gemas axilares, sendo eliminadas a gema apical de cada segmento, e as folhas correspondentes a cada uma das gemas axilares (com um corte feito no pecíolo a 3mm de distância da axila foliar).

Estas microestacas assim obtidas foram colocadas em frascos de 250 ml de capacidade contendo 30 ml de meio de cultura MS solidificado com 0,7% ágar e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a $121 \pm 1^\circ \text{C}$ por 20 minutos.

No primeiro experimento Kin e BAP foram utilizados na concentração de $18,5 \mu\text{M}$ e $17,7 \mu\text{M}$ respectivamente, e TDZ ($0,01 \mu\text{M}$), adicionados no meio de cultura básico MS modificado por Torres, Vecchia e Caldas (1978) Os tratamentos com BAP e TDZ se deu pela substituição da Kin do meio básico pelas concentrações correspondentes destes dois compostos.

O experimento foi instalados em sala de crescimento com temperatura controlada de $26 \pm 1^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro). Foi empregado o delineamento

experimental inteiramente casualizado com 5 repetições, sendo cada parcela constituída por 3 frascos e 2 estacas por frasco.

A avaliação foi realizada aos 30 dias após a repicagem com observação dos seguintes parâmetros: número de brotos, comprimento de brotos, peso de matéria fresca e de matéria seca.

No segundo experimento foram realizados dois ensaio (A e B). No ensaio preliminar (A) utilizou-se diferentes níveis de TDZ 0,0; 0,03; 0,30 e 3,0 mg/L adicionado ao meio MS modificado por Torres, Vecchia e Caldas (1978). O experimento foi instalados em sala de crescimento com temperatura controlada de $26 \pm 1^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro). Foi empregado o delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 repetições, sendo cada parcela constituída de 3 frascos e 2 estacas por frasco.

No ensaio (B) utilizou-se 0,0; 0,19; 0,38; 0,76; 1,52 e 3,04 mg/L de TDZ adicionado ao meio MS modificado por Torres, Vecchia e Caldas (1978). O experimento foi instalados em sala de crescimento com temperatura controlada de $26 \pm 1^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro). Foi empregado o delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 repetições, sendo cada parcela constituída de 3 frascos e 2 estacas por frasco.

As avaliações foram realizadas aos 45 dias após as repicagens com observação dos seguintes parâmetros: número de brotos, comprimento de brotos, peso de matéria fresca e de matéria seca.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Experimento 1 - Efeito de diferentes citocininas

A análise dos resultados obtidos (Quadro 02) mostram que os três tipos de citocininas, Kin, BAP e TDZ tiveram efeitos semelhantes na indução e multiplicação de brotações *in vitro* de segmentos nodais de repolho do clone 400.

QUADRO 02 - Resumo das análises de variância para número e comprimento de brotos, peso da matéria fresca e matéria seca do clone 400 em três tipos de citocininas.

Causa de Variação	GL	Quadrados médios			
		Número de brotos	Comprimento de brotos	Peso de mat. fresca	Peso de mat. seca
Citocininas	2	1,1840 ^{NS}	0,1254 [*]	0,0445 ^{NS}	0,00059 ^{NS}
Resíduo	12	1,5077	0,0284	0,0291	0,0003
C.V.(%)		22,74	17,96	39,58	33,27
Média		5,40	0,94	0,43	0,05

^{NS} Não significativo, e ^{*} significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

O número médio de brotos produzido foi de 5,4 por frasco ou seja 2,7 brotos por explante em cada tratamento, num período de 30 dias após a repicagem (Figura 05).

A ausência de diferenças entre as várias citocininas está de acordo com os resultados obtidos por Nieuwkerk, Zimmerman e Fordham (1986) na propagação de brotos de maçã, com os obtidos por Innecco (1993) na indução de brotações de plântulas de pimentão, e aos de Deng, Heap e Klein (1991), que trabalhando com cotiledone de *B. campestris*, não encontraram diferença significativa entre Kin e BAP para número de brotos produzidos.

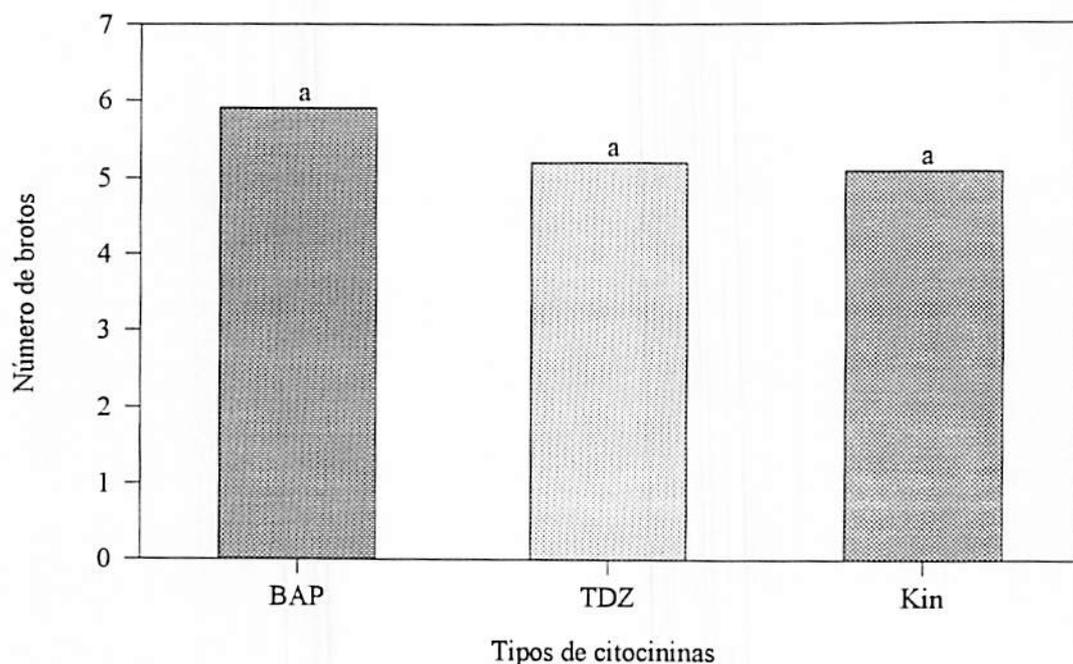


FIGURA 05 - Representação gráfica do número de brotos por frasco produzidos através de segmentos nodais do clone 400, em função das citocininas (BAP, TDZ e Kin).

O TDZ por ter um efeito citocinínico mais elevado, foi aplicado numa concentração 40 vezes mais baixa do que o BAP e o Kin. No entanto, esta dosagem foi suficiente para estimular e promover o desenvolvimento dos brotos laterais das microestacas, os quais atingiram um comprimento médio igual ao das outras duas citocininas.

Entretanto, houve uma diferença significativa no comprimento médio dos brotos entre os tratamentos com Kin e BAP de acordo com os resultados apresentados na Figura 06. A concentração de 4mg/L de BAP permitiu a indução de brotações laterais das microestacas, no entanto, o crescimento desses brotos foi inibido pela presença da citocinina no meio de cultura. Embora a concentração de Kin ter sido igual a concentração de BAP, a Kin promoveu maior desenvolvimento das brotações. Este efeito está relacionado com o potencial de cada citocinina. Segundo Hu e Wang (1983), o BAP é uma citocinina muito eficaz para a multiplicação, seguida

em ordem decrescente pela Kin; mas, de acordo com Grattapaglia e Machado (1990) isto não é uma regra e, conforme a espécie, as citocininas podem apresentar resultados variados.

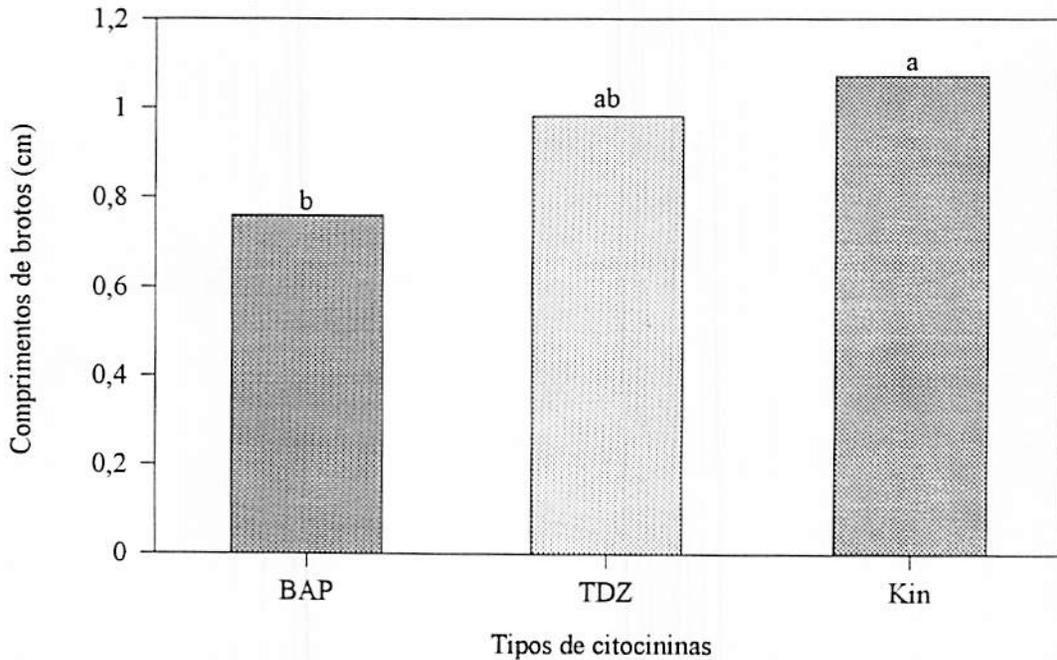


FIGURA 06 - Representação gráfica dos valores médios de comprimento de brotos produzidos através de segmentos nodais do clone 400 em função das citocininas (BAP, TDZ e Kin).

Para as variáveis peso da matéria fresca e peso de matéria seca, não foi verificado nenhuma diferença significativa entre os tratamentos (Figura 07 e 08).

Apesar dos brotos produzidos na presença do BAP terem sido menores, todos os brotos obtidos em cada tratamento foram considerados aparentemente de boa qualidade, portanto aptos a se desenvolverem em plantas normais.

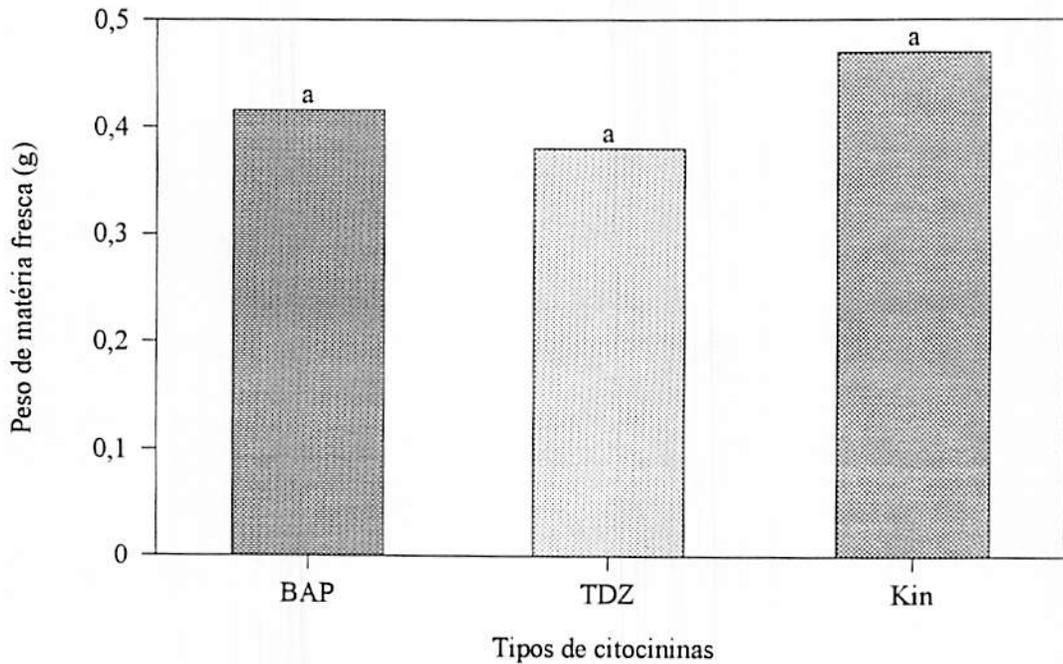


FIGURA 07 - Representação gráfica dos valores médios de peso de matéria fresca de brotos produzidos através de segmentos nodais do clone 400, em função das citocininas (BAP, TDZ e Kin).

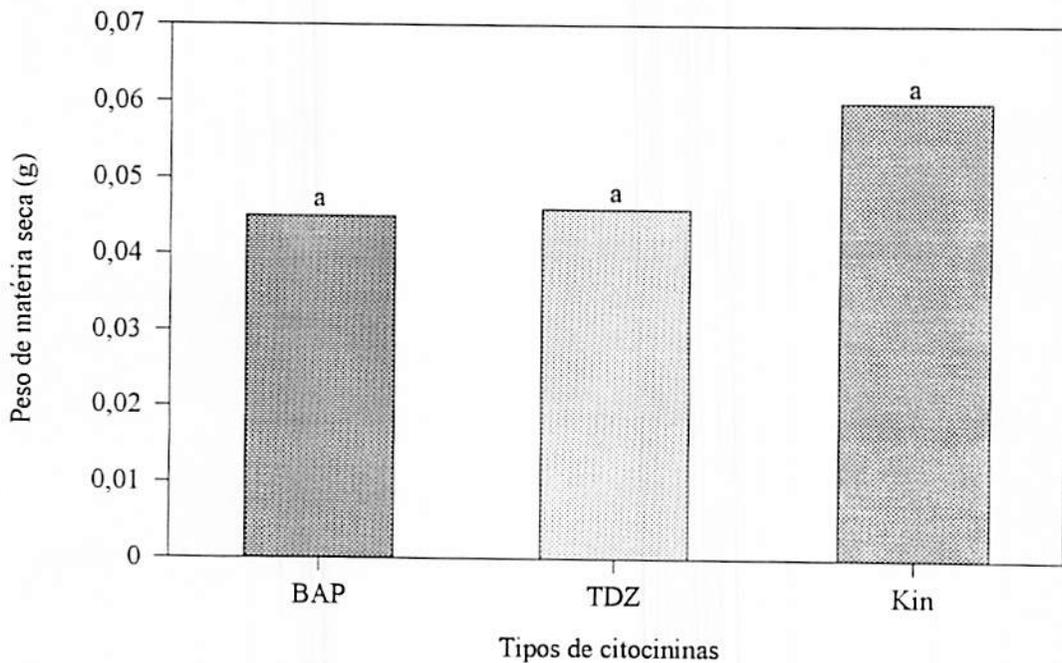


FIGURA 08 - Representação gráfica dos valores médios de peso de matéria seca de brotos produzidos através de segmentos nodais do clone 400, em função das citocininas (BAP, TDZ e Kin).

3.4.2 Experimento 2 (A) - Efeito de diferentes níveis de TDZ

O Quadro 03 mostram que ocorreram diferença significativa para o número de brotos produzidos em razão das concentrações do TDZ. As dosagens de 0,3 e 3,0 mg/L de TDZ foram os tratamentos que proporcionaram os maiores números médio de brotos sendo 15,2 e 17,9 respectivamente em relação a testemunha, embora estes pontos estejam representadas bem distantes, eles indicam uma tendência á estabilização após a concentração de 0,3 mg/L, como mostra a equação de regressão assintótica (equação de Mitscherlich) (Figura 09).

QUADRO 03 - Resumo das análises de variância para número de brotos, comprimento médio de brotos, peso da matéria fresca e peso da matéria seca da família clonal 007 em diferentes concentrações de TDZ.

Causa de Variação	GL	Quadrados médios e significância ¹			
		Número de brotos	Comprimento de brotos	Peso de mat. fresca	Peso de mat. seca
Níveis	3	2,2927**	0,0499**	0,3327**	0,0016**
Resíduo	12	0,3212	0,0042	0,0349	0,0002
C. V.(%)		16,33	5,62	14,06	1,81
Média		3,47	1,16	1,33	0,76

¹ Dados transformados para raiz ($x + 0,5$)

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Por outro lado, o comprimento de brotos teve um comportamento inverso daquele obtido com o número de brotos, embora os pontos estejam um pouco disperso na curva não permitindo um ajuste mais adequado, a equação de regressão assintótica pode ser usada para descrever os resultados para as dosagens de TDZ utilizadas. O maior comprimento dos brotos foi obtidos com o tratamento onde não foi aplicado o TDZ, sendo 1,25 cm, no entanto, as concentrações de 0,03, 0,3 e 3,0 mg/L de TDZ apresentaram um comprimento médio próximo entre si de 0,77, 0,65 e 0,72 cm respectivamente (Figura 10).

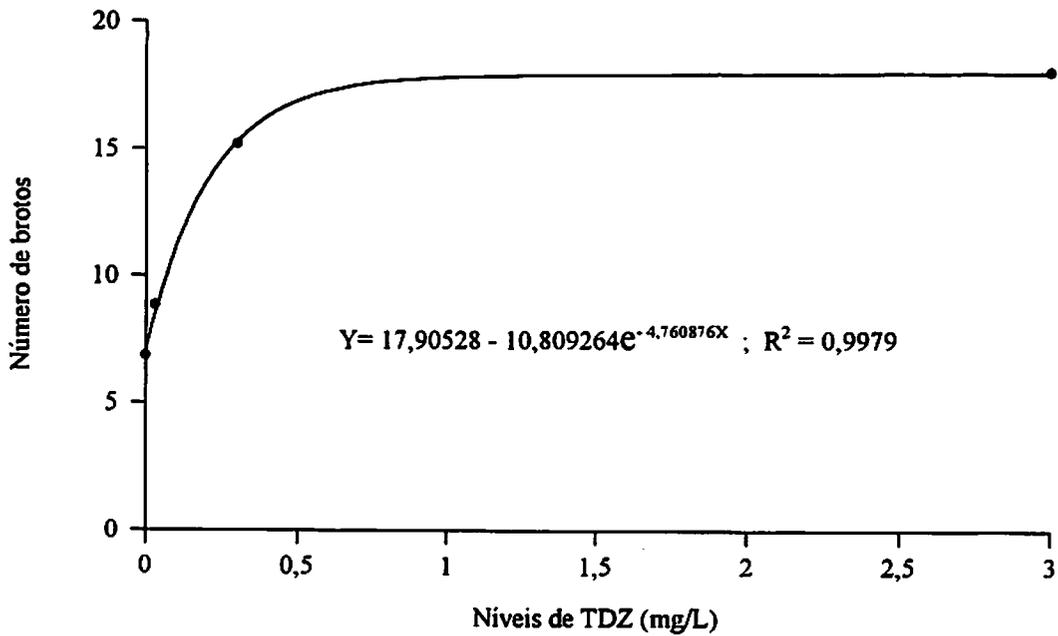


FIGURA 09 - Representação gráfica dos valores médios e da equação de regressão para número de brotos adventícios obtidos através de segmentos nodais da família clonal 007, em função de diferentes níveis de TDZ.

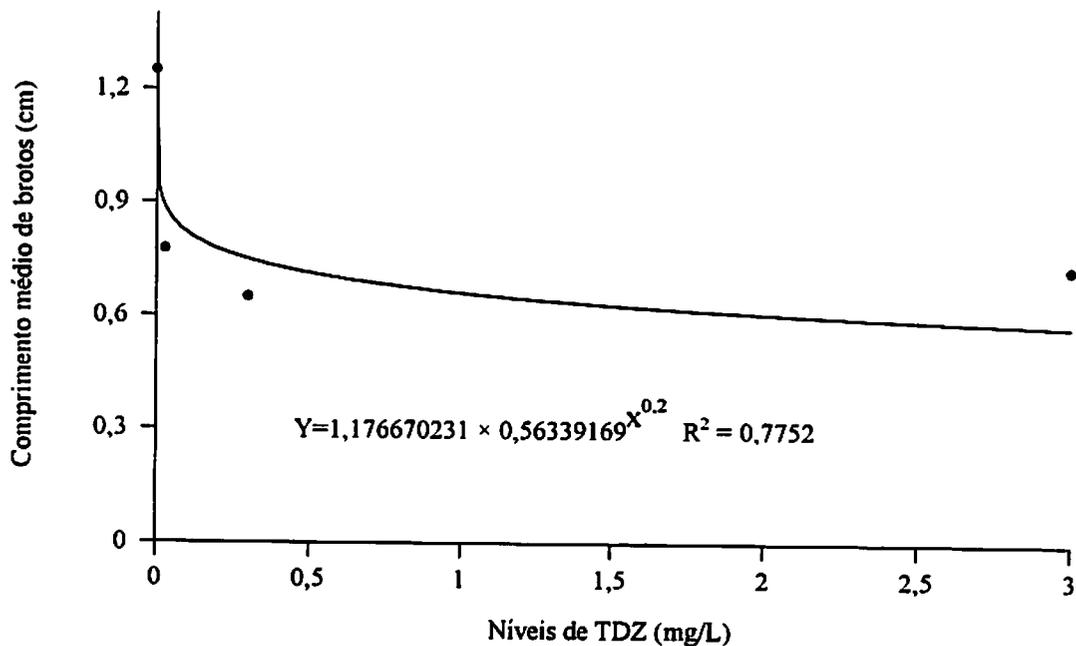


FIGURA 10 - Representação gráfica dos valores médios e da equação de regressão para comprimento de brotos adventícios obtidos através de segmentos nodais da família clonal 007, em função de diferentes níveis de TDZ.

Os resultados mostram que o número de brotos é inversamente proporcional ao seu crescimento. Esta relação é geralmente atribuída ao efeito que as citocininas provocam no desenvolvimento de plantas. As citocininas são requeridas na fase de indução de brotações mas, após esta fase, seu contato com o tecido por um tempo prolongado acaba inibindo o crescimento (Grattapaglia e Machado, 1990).

Os resultados obtidos neste trabalho concordam com aqueles obtidos por Carvalho e Pinto (1993), na multiplicação de *Helicônia* sp onde relataram uma relação inversa entre número de brotos produzidos e o comprimento deles.

Nas concentrações de TDZ onde ocorreu uma maior proliferação de brotos o desenvolvimento destes também foi afetado. Houve um entumescimento na base do explante inicial de onde partiram vários brotos adventícios resultando um entufamento excessivo, apresentando ainda uma redução no tamanho das folhas e encurtamento dos entrenós (Figura 11), sendo os mesmos sintomas observados por Lu (1993) em trabalhos realizados com TDZ em concentração mais elevada.

Os resultados obtidos para peso de matéria fresca e matéria seca (Figura 12 e 13) representada por curvas de regressão assintótica mostram que estes parâmetros tiveram um comportamento semelhante ao representado pela curva de número de brotos. Isto quer dizer que os tratamentos onde houveram aplicações de TDZ promoveram maiores produções de matéria seca do que a testemunha, sem a aplicação de TDZ. Embora o comprimento dos brotos terem sido maiores na testemunha, os outros tratamentos (com TDZ) produziram uma quantidade de brotos maior, proporcionando um maior ganho de peso. Entre os tratamentos com TDZ, o ganho de peso foi mais acentuado entre 0,03 e 0,3 mg/L passando de 0,94 g para 2,0 g para peso de matéria fresca e 0,076 g para 0,115 g para peso de matéria seca, a partir da concentração de 0,3 mg/L

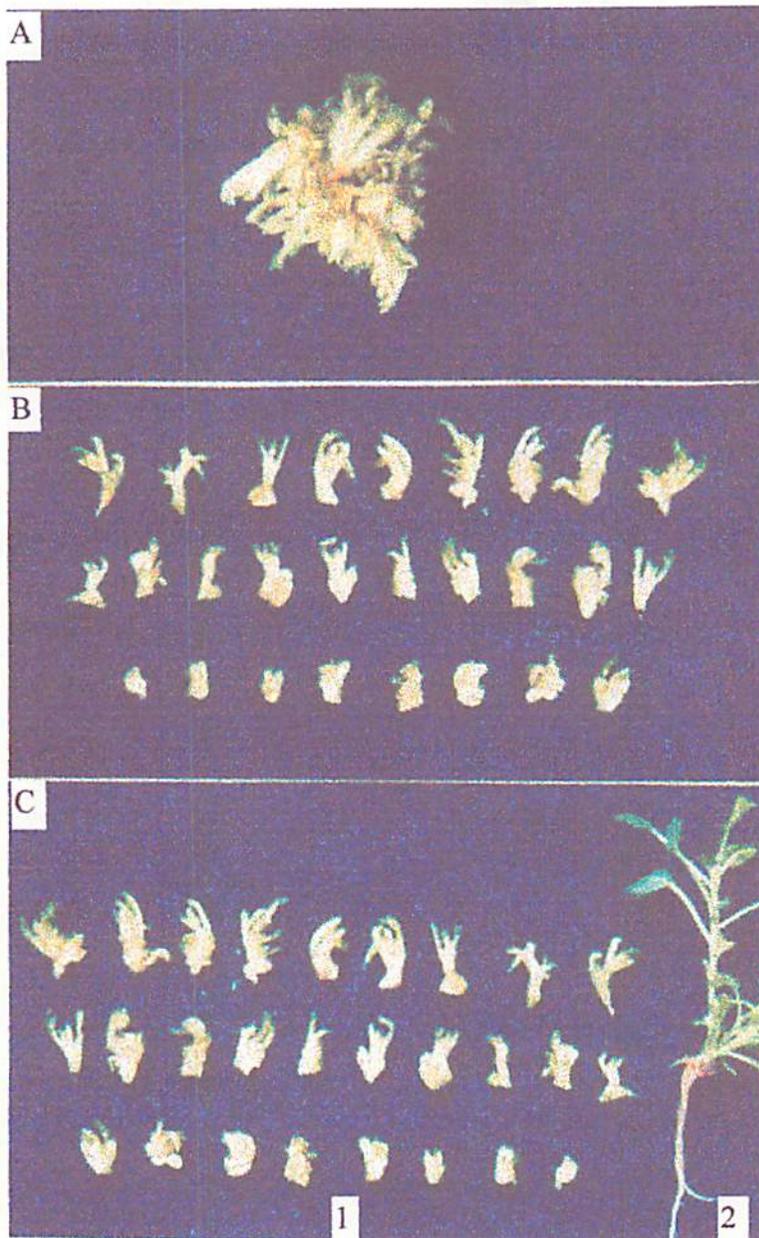


FIGURA 11 - Brotos obtidos do cultivo *in vitro* da família clonal 007 em diferentes níveis de TDZ. a) brotações obtidas a partir do explante primário, b) número de brotos isolados do explante primário e c) comparação de brotos obtidos entre o tratamento com 3,0 mg/L de TDZ (1) e o tratamento sem TDZ (2).

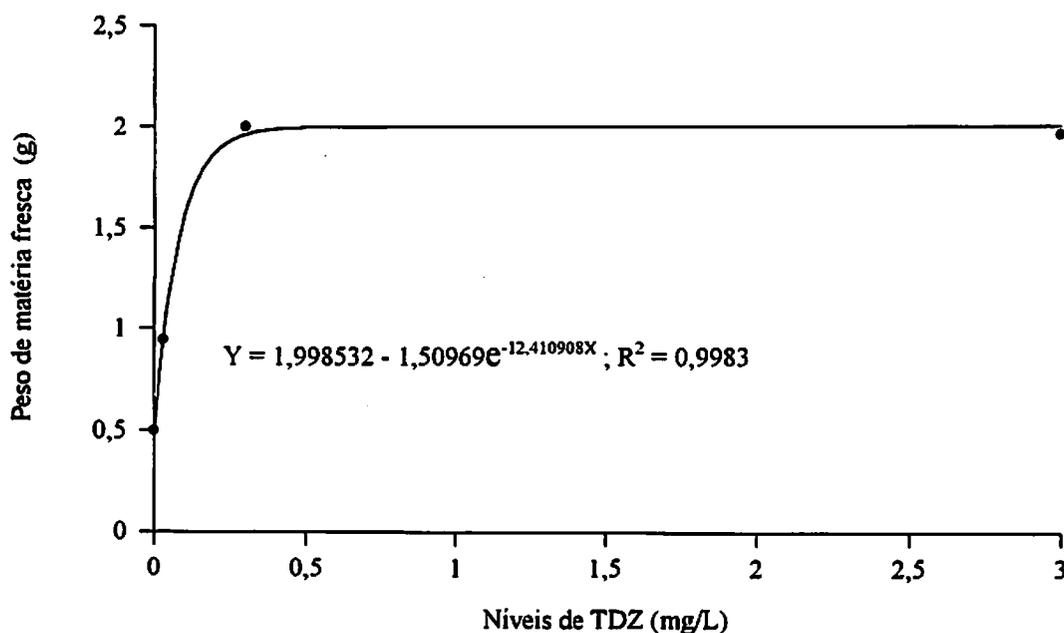


FIGURA 12 - Representação gráfica de valores médios e da equação de regressão para peso de matéria fresca de brotos adventícios obtidos através de segmentos nodais da família clonal 007, em função de diferentes níveis de TDZ.

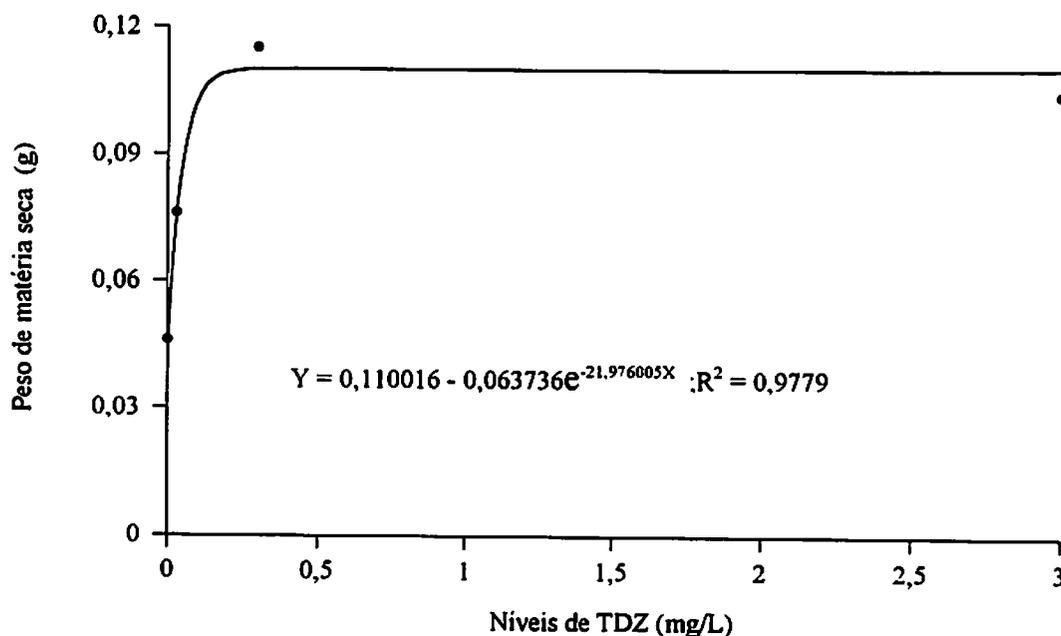


FIGURA 13 - Representação gráfica dos valores médios e de regressão para peso de matéria seca de brotos adventícios obtidos através de segmentos nodais da família clonal 007, em função de diferentes níveis de TDZ.

houve uma estabilização dos valores até a concentração de 3,0 mg/L de TDZ. Resultados semelhantes foram observados por Sato (1994) na propagação de *Gérbera* sp.

Os brotos produzidos nos tratamentos com aplicação de TDZ foram muito reduzidos devido ao efeito de inibição do crescimento causado pela presença deste composto no meio de cultura durante todo o período de incubação do experimento. Este efeito é mais pronunciado para o TDZ em função dele ser mais estável no meio de cultura, uma vez que é resistente a citocininas- oxidases, e assim, sua atividade é mais prolongada. No entanto, estas brotações, mesmo pequenas, quando transferidas para meio de cultura MS sem adição de qualquer tipo de reguladores de crescimento, foram capazes de desenvolverem-se de forma normal e tornarem-se uma muda viável para aclimatação.

Em decorrência deste estudo sugere-se, também, ensaio onde poderá reduzir o efeito do TDZ na inibição do crescimento dos brotos pela diminuição do tempo de exposição deste, em contato com o explante inicial, transferindo as brotações para outro meio de cultura de acordo com o tempo de exposição requerido para cada clone.

A família clonal 007 apresenta boas características para o programa de melhoramento. Entretanto, o número de gemas viáveis na cabeça do repolho nesta família clonal é bastante reduzido, produzindo em média de 6 a 10 novas plantas, o que proporciona assim uma pequena taxa de multiplicação. A utilização do TDZ mostrou ser bastante viável para a multiplicação em larga escala dos clones desta família de difícil multiplicação. Em complementação, foi instalado um segundo experimento utilizando concentrações intermediárias de TDZ para maximizar a melhor concentração desse regulador de crescimento na multiplicação do repolho (família clonal 007).

3.4.3 Experimento 2 (B) - Efeito de diferentes níveis de TDZ

A partir dos resultados obtidos no experimento (A), foi instalado um segundo ensaio com intervalos de concentrações menores do que os utilizados no primeiro ensaio, permitindo assim, uma avaliação mais precisa do efeito do TDZ, principalmente, nas concentrações entre 0,3 e 3,0 mg/L. Os resultados obtidos (Quadro 04) mostram que houve diferença significativa entre as concentrações de TDZ utilizadas.

QUADRO 04 - Resumo das análises de variância para número de brotos, comprimento médio de brotos, peso da matéria fresca e peso da matéria seca da família clonal 007 em diferentes concentrações de TDZ.

Causa de Variação	GL	Quadrados médios e significância			
		Número de brotos	Comprimento de brotos	Peso de mat. fresca	Peso de mat. seca
Níveis	5	70,9021**	0,1173**	8,3474**	0,0049**
Resíduo	24	1,2336	0,0060	0,3227	0,00023
C.V.(%)		8,29	10,06	14,98	11,12
Média		13,39	0,77	3,79	0,13

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

A maior variação no aumento de brotos foi verificada entre a testemunha de (5,88 brotos) para o nível 0,19 mg/L de TDZ (14,42 brotos), por outro lado entre o nível 0,19 e 3,04 mg/L, a variação no número de brotos produzidos foi 14,42 para 15,6 mostrando que a partir de 0,19 mg/L houve uma estabilização no número de brotos produzidos. Como mostra a curva de regressão assintótica da Figura 14. Portanto, a dosagem de 0,19 mg/L, para a família clonal 007 de difícil propagação, foi mais efetiva na multiplicação, apresentando uma melhor qualidade de brotos adventícios. Na Figura 15 mostra o efeito de diferentes concentrações do TDZ na indução de brotos adventícios.

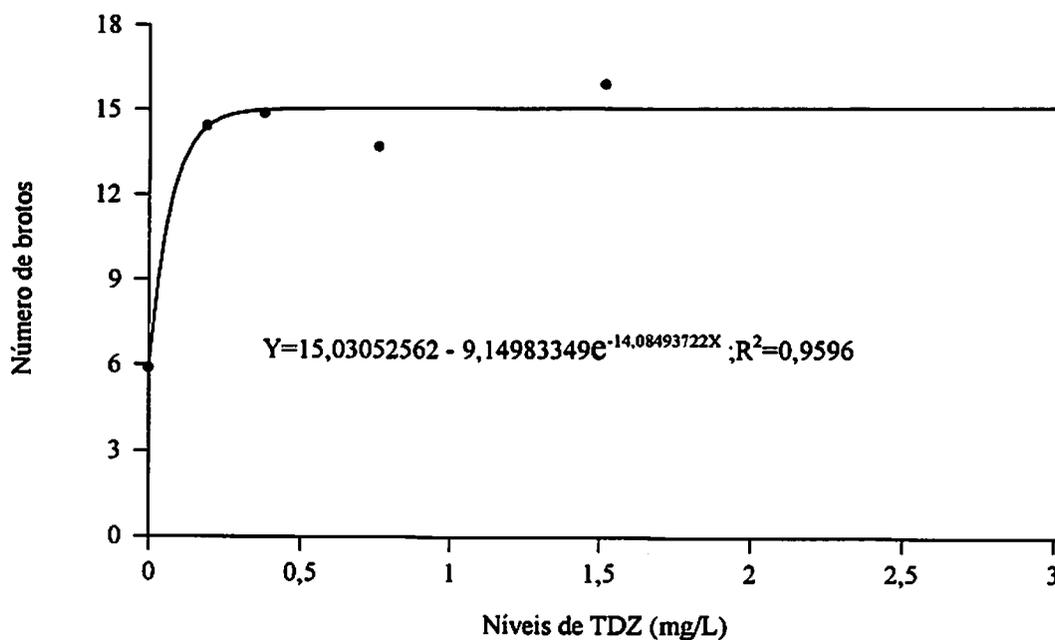


FIGURA 14 - Representação gráfica dos valores médios e da equação de regressão para número de brotos adventícios obtidos através de segmentos nodais da família clonal 007, em função de diferentes níveis de TDZ.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Carvalho e Pinto (1993), na multiplicação de *Helicônia*, sp onde o maior número de brotos foi obtido em baixa concentração (0,25 mg/L) de TDZ. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que concentrações bastante reduzidas são suficientes para induzir a formação de grande número de brotos. Estes dados também estão de acordo aos obtidos por outros autores na propagação de outras espécies, como *gérbera* sp (Sato, 1994); híbridos de *Acer x Fremanii* (Kerns e Meyer, 1986) e pimentão (Innecco, 1993).

Para comprimento médio de brotos a equação de regressão assintótica utilizada (Figura 16) no segundo experimento (B), apresentou resultados semelhantes aos obtidos no ensaio anterior, ou seja, concentrações menores de TDZ, mostrou uma redução mais acentuada no comprimento de brotos, observada entre a testemunha e o nível 0,19 mg/L, enquanto que para os

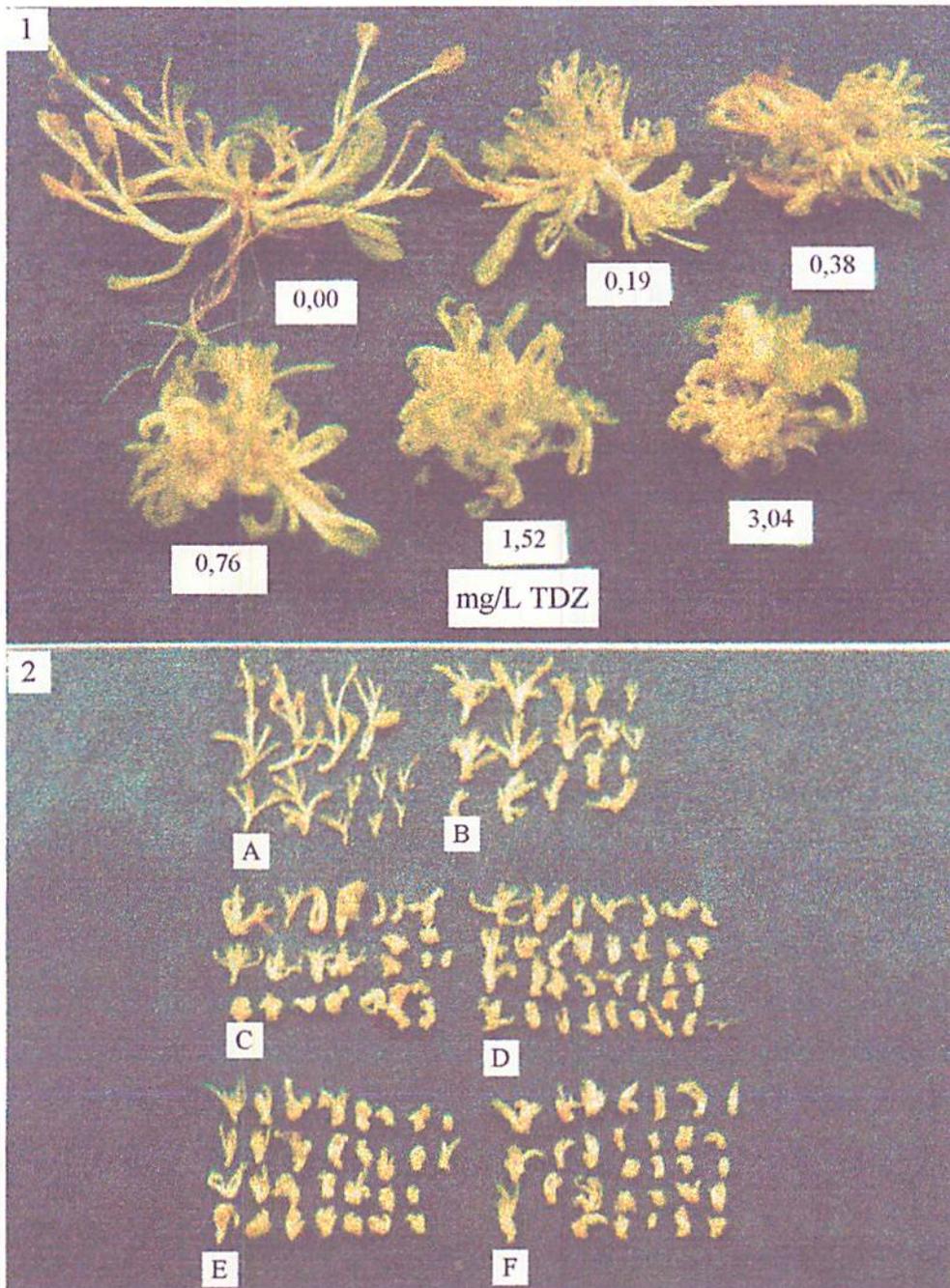


FIGURA 15 - 1: brotos adventícios obtidos a partir do explante primário da família clonal 007 em diferentes níveis de TDZ (exp. B) - 2: amostra do número de brotos isolados a partir do explante primário.

níveis entre 0,19 e 0,76 mg/L a redução foi mais suave chegando a pequenas diferenças não significativas para os níveis acima de 0,76 mg/L de TDZ. Estes resultados mostram o efeito do TDZ na redução do alongamento das brotações.

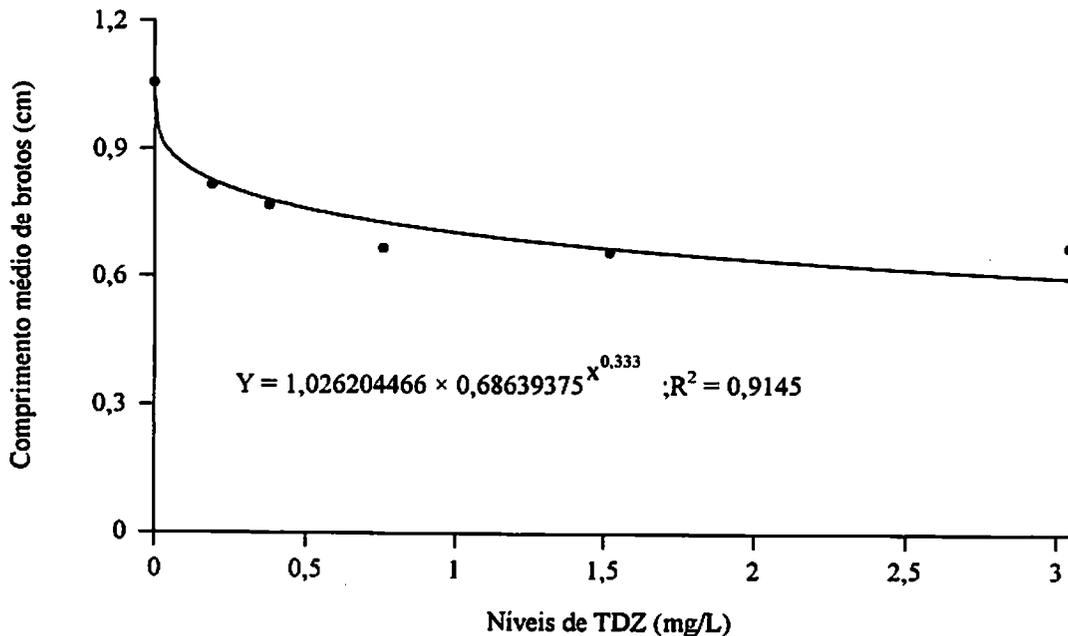


FIGURA 16 - Representação gráfica dos valores médios e da equação de regressão para comprimento de brotos adventícios obtidos através de segmentos nodais da família o clonal 007, em função de diferentes níveis de TDZ.

A equação de regressão assintótica também, foi mais adequada para ajustar os resultados obtidos, para peso de matéria fresca e peso de matéria seca (Figuras 17 e 18). Os ganhos de pesos registrados neste ensaio, também, mostraram um comportamento semelhante ao obtido para número de brotos, no qual ocorreu um aumento acentuado de ganho de peso entre a testemunha e o nível de 0,19 mg/L, acima deste nível, até 3,04 mg/L, não foi verificada nenhuma diferença significativa, confirmando a hipótese do ensaio preliminar (A), de que o TDZ estimulou

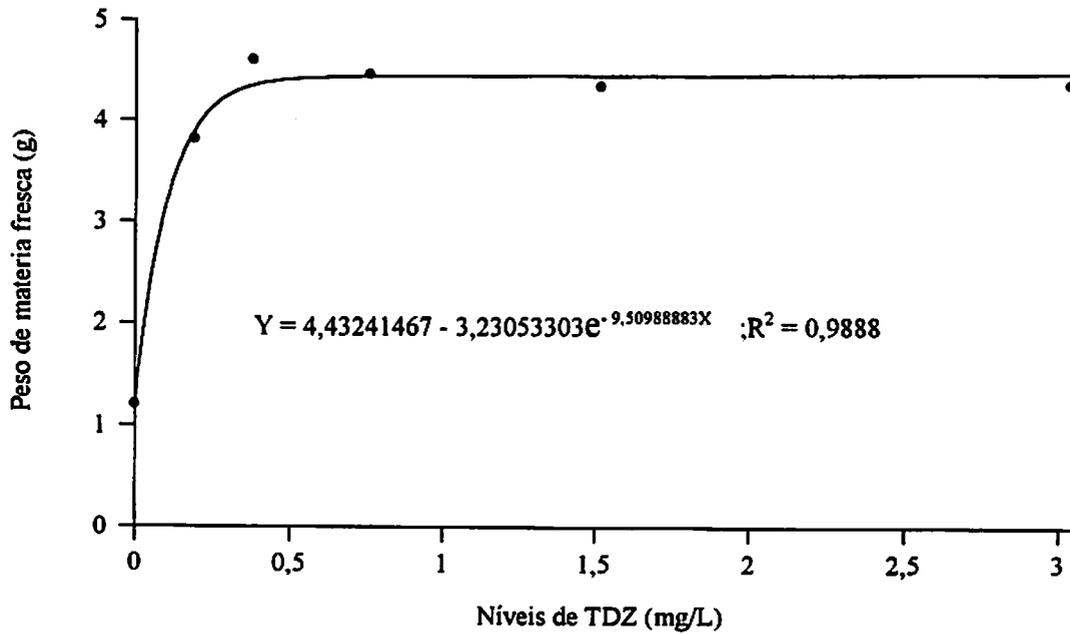


FIGURA 17 - Representação gráfica dos valores médios e da equação de regressão para peso de matéria fresca de brotos adventícios obtidos através de segmentos nodais da família clonal 007, em função de diferentes níveis de TDZ.

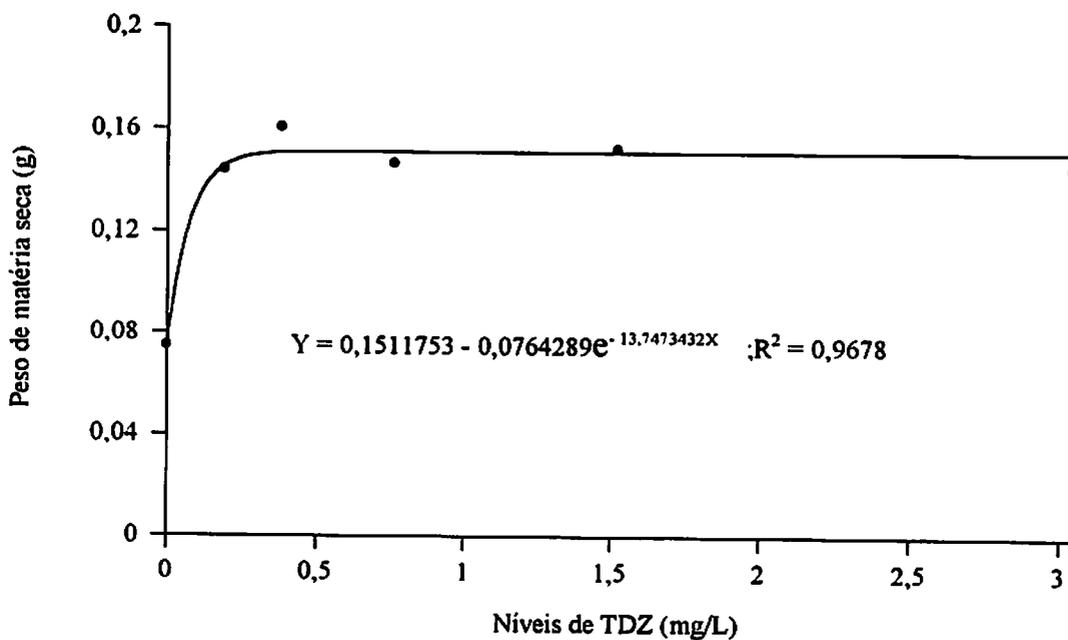


FIGURA 18 - Representação gráfica dos valores médios e da equação de regressão para peso de matéria seca de brotos adventícios obtidos através de segmentos nodais da família clonal 007, em função de diferentes níveis de TDZ.

a indução de grande número de brotos em concentrações bastante reduzidas até (0,19 mg/L) e que acima desta concentração, ocorre uma tendência de estabilização na indução de novos brotos e no aumento dos pesos de matéria fresca e seca. O ganho de peso das brotações mostra a função de dreno quando foi utilizado o TDZ.

3.5 CONCLUSÕES

Experimento 1

Embora tenha ocorrido uma pequena diferença no comprimento médio dos brotos entre Kin e BAP, os três tipos de citocininas foram considerados equivalentes na indução e multiplicação *in vitro*.

Experimento 2 (A)

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que as concentrações de 0,3 e 3,0 mg/L de TDZ adicionados ao meio de cultura MS modificado proporcionaram os maiores número médio de brotos (15,2 e 17,9) respectivamente, viáveis para a multiplicação da família clonal 007 de repolho.

Experimento 2 (B)

A concentração de TDZ mais adequada para a multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de repolho avaliada neste experimento foi de 0,19, mg/L. Os resultados obtidos nesta concentração foram superiores a testemunha para os parâmetros avaliados exceto para comprimento médio de brotos, e embora não tenha sido verificado diferença significativa entre

0,19 mg/L e as demais dosagens de TDZ, esta concentração representou uma dosagem econômica em relação aos outros níveis testados além de apresentar melhor qualidade dos brotos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAJAJ, Y.P.S.; NIETSCH, P. *In vitro* propagation of red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata). *Journal of Experimental Botany*, London, v.26, p.883-890, 1975.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.(eds.) *Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.37-69.
- CAPELLE, S.C.; MOK, D.W.S.; KIRCHNER, S.C.; MOK, M.C. Effects of Thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)[8¹⁴-C] adenosine in calus tissue of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Physiology*, Washington, v.73, p.796-802, 1983.
- CARVALHO, D.G.; PINTO, J.E.B.P. Multiplicação de *Heliconia* sp. *in vitro* através do uso de TDZ e BAP. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, Brasília, 1993. Resumos... Brasília: EMBRAPA, 1993. p.152.
- DEBERGH, P.; AITKEN-CHRISTIE, J.; COHEN, D.; GROUT, B. VON ARNOLDS, S.; ZIMMERMAN, R.; ZIV, M. Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. *Plant Cell, tissue and Organ Culture*, Netherlands, v.30, p.135-140, 1992.
- DENG, S.Y.; HEAP, I.M.; KLEIN, T.A. *In vitro* vegetative propagation of *Chinese Cabbage*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.26, p.135-139, 1991.
- DIETERT, M.F.; BARRON, S.A.; YODER, O.C. Effects of genotype on *in vitro* culture in the genus *Brassica*. *Plant Science Letters*, Limerick, v.26, p.233-240, 1982.
- DUNWELL, J.M. *In vitro* regeneration from excised leaf discs of three *Brassica* species. *Journal of Experimental Botany*, London, v. 32, p.789-799, 1981.
- FELLMAN, C.D.; READ, P.E.; HOSIER, M.A. Effects of Thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. *HortScience*, Alexandria, v.22, p.1179-1200, 1987.
- GIORDANO, L.B. Melhoramento de Brássica. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.98, n.9, p.20-45, fev. 1983.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.(eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-169.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y.(eds). **Handbook of Plant Cell Culture**. Techniques for propagation and breeding. New York: Macmillan Publishing Company, v.1, p.117-127, 1983.
- INNECCO, R. **Propagação vegetativa de pimentão *Capsicum annuum* L. através de métodos *in vitro* e estacas**. Lavras: ESAL, 1993. 105p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- KERNS, H.R.; MEYER, M.M. Tissue culture propagation of *Acer x Freemanii* using Thidiazuron to stimulate shoot tip proliferation. **HortScience**, Alexandria, v.21, p.1209-1210, 1986.
- KUO, C.G.; TSAY, J.S. Propagation chinese cabbage by axillary bud culture. **HortScience**, Alexandria, v.12, p.456-457, 1977.
- LAZZERI, P.A.; DUNWELL, J.M. *In vitro* shoot regeneration from seedling root segments of *Brassica oleracea* and *Brassica napus* cultivars. **Annals of Botany**, London, v.54, p.341-350, 1984.
- LAZZERI, P.A.; DUNWELL, J.M. *In vitro* regeneration from seedling organs of *Brassica oleracea* var. italica Plenck cv. Green Comet. Effect of plant Growth Regulators. **Annals of Botany**, London, v.58, p.689-697, 1986.
- LEIKE, H. Cabbage (*Brassica oleracea* L. capitata). In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. v.6, p.226-251.
- LINSMAYER, E.M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.18, p.100-127, 1965.
- LU, C.Y. The use of Thidiazuron in tissue culture. **In vitro Cell Development Biology**, New York, v.29, p.92-96, 1993.
- MEYER, H.J.; VAN STADEN, J. *In vitro* multiplication of *Ixia flexulsa*. **HortScience**, Alexandria, v.6, n.23, p.1070-1071, 1988.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; ARMSTRONG, G.D.J. Cytokinin activity of N-phenyl-N1,2,3-thiadiazol-5-GL urea (Thidiazuron) **Phytochemistry**, London, v.21, p.1509-1511, 1982.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.G.; MUJER, C.V. Biological and biochemical effects of cytokinin - active phenylurea derivatives in tissue culture systems, **HortScience**, Alexandria, v.6, n.22, p.1194-1197, 1987.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

- NANDA KUMAR, P.B.A.; SHIVANNA, K.R. *In vitro* multiplication of a sterile interspecific hybrid, *B. fruticulosa* x *B. campestris*. **Plant Cell, Tissue and Organ culture**, Dordrecht, v.26,p.17-22, 1991.
- NIEUWKERK, J.P.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v.21, p.516-518, 1986.
- PAEK, K. Y.; CHANDLER, S. F.; THORPE, T. A. *In vitro* propagation of chinese cabbage from seedling shoot tips. **Journal American Society horticultural Science**, New York, v.112, n.5, p.841-845, 1987.
- SATO, A.Y. **Propagação de Gérbera de vaso através da cultura de tecidos**. Lavras: UFLA, 1994. 95p. (dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- SUTTLE, F.C. Involvement of Ethylene in the action of the cotton defoliant Thidiazuron. **Plant Physiology**, Copenhagen, v.78, p.272-276, 1985.
- YANG, -Z.; JIA, S-R.; PUA, E-C. High frequency of plant regeneration from hypocotyl explants of *Brassica carinata* A. Br. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.24, p.79-82, 1991.

4 EFEITO DA CONSISTÊNCIA DO MEIO DE CULTURA E TIPO DE TAMPA NA MICROPROPAGAÇÃO DE REPOLHO

RESUMO

Entre os fatores físicos que afetam o desenvolvimento de plantas *in vitro*, foram avaliados a consistência do meio de cultura e três tipos de tampas na propagação de segmentos nodais de repolho. A consistência do meio variou entre meio semi-sólido e meio líquido com utilização de ponte de papel de filtro. Foi colocada uma microestaca por tubo de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 ml de meio de cultura MS modificado, com pH ajustado para $5,8 \pm 1$. Em outro experimento variou o tipo de tampa (Metal, Vitafilme^{R1} e Plástica) com duas microestacas por frasco de 250 ml contendo 30 ml de meio MS modificado. Todo o material foi mantido em sala de crescimento com temperatura de $26 \pm 1^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 18/6 horas (Luz/escuro) e 2500 lux de luminosidade. A avaliação, feita aos 30 dias após a repicagem, mostrou que fatores físicos como consistência do meio de cultura e os diferentes tipos de tampas utilizados nestes experimentos não tiveram efeitos significativos sobre a taxa de multiplicação da microestacas da família clonal 800 de repolho.

¹ Filme de PVC transparente

4.1 REFERENCIAL TEÓRICO

O estabelecimento e multiplicação de uma determinada espécie vegetal *in vitro* está sujeito a influência de diversos fatores que atuam em cada uma das fases deste processo. A combinação adequada de todos estes fatores é que irá definir um protocolo de propagação para cada espécie.

As concentrações dos sais e dos reguladores de crescimento nos meios de cultura, bem como a temperatura e fotoperíodo são os fatores que mais variam entre as espécies micropropagadas. Outros fatores, também importantes, podem influenciar o desenvolvimento de algumas culturas, como a utilização de agentes geleificantes dos meios de cultura e os tipos de tampas empregadas no fechamento dos frascos.

Os meios utilizados em cultura de tecidos podem ser líquidos ou semi-sólidos. De acordo com Grattapaglia e Machado, 1990 a utilização de um meio líquido normalmente tende a estimular melhor a formação de um sistema radicular. Entretanto, exige algum tipo de suporte ou agitação para fornecer o oxigênio necessário para a respiração do explante (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990; Biondi e Thorpe, 1981).

A incubação dos explantes em meio de cultura líquido sob agitação foi fundamental para a multiplicação da parte aérea, a partir de segmentos nodais de árvores adultas de *Eucalyptus citriodora* (Gupta, Mascarenhas e Jogannathan, 1981).

Uma espécie pode requerer uma consistência de meio de cultura diferente em cada um dos três estágios do seu desenvolvimento, Ou seja, no estágio I (fase de estabelecimento) pode ser conduzido em meio líquido, enquanto nos estágios II (multiplicação) e III (alongamento) em

meio sólido, ou então, no estágio I e II desenvolver melhor no meio líquido e no estágio III no meio sólido (Murashige, 1974).

A mudança de estado físico do meio nutritivo foi empregada por Steward (1958) citado por Murashige (1974), para propagação de *Asparagus officinalis* e *Dacus carota*.

Murashige (1974), relata que a iniciação da cultura *in vitro* de bromélias ocorre mais facilmente quando se utiliza meio de cultura líquido, isto tem sido verificado também, para orquídea 'Cattleya'. Por outro lado, a cultura de brotos apicais de aspargos e gérbera requerem para sua iniciação meio semi-sólido.

Segundo Rodrigues (1994), a cultura em meio semi-sólido apresentou resultados mais satisfatório para a bulbificação *in vitro* de cebola quando comparado ao meio líquido.

É possível que as concentrações ótimas de sais, num meio sólido sejam mais elevadas do que as concentrações ótimas para o crescimento em meio líquido, devido às restrições na velocidade de difusão de nutrientes que o meio sólido impõe (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990).

O ágar, além do efeito no potencial mátrico do meio de cultivo, alterando a disponibilidade de água, nutrientes e fitoreguladores, pode modificar a composição química do meio conforme o teor de impurezas (Grattapaglia e Machado, 1990). Romberger e Tabor (1971) relataram que o crescimento de brotos de *Picea abies* foi significativamente influenciado pela qualidade do ágar. Segundo Singha (1982), a presença de inibidores no ágar pode evitar a proliferação de brotos. A concentração de ágar necessário para obter uma geleificação conveniente depende de alguns fatores como, qualidade do ágar e do nível do pH. Geralmente, o pH sendo mais ácido o meio tende a ser menos consistente (Murashige, 1974). Um aumento de

0,5% para 2% na concentração de ágar provocou uma queda de 70% para 10% na taxa de enraizamento de citrus (Kitto e Young, 1981).

Heller, Darpas, Devillers e Richez (1968) citado por Caldas, Haridasan e Ferreira (1990), mostraram que a absorção de fosfato por tecido de cenoura foi inicialmente mais rápida em meio líquido do que em meio sólido, e ao mesmo tempo, os tecidos crescendo em meio líquido tinham 50% mais água por grama de matéria seca do que os tecidos em meio sólido, após 30 dias de incubação.

Segundo Lee, Wetzstein e Sommer (1986) as raízes no meio líquido foram mais compridas do que aquelas cultivadas em meio semi-sólido, e a proporção de brotos enraizadas também foi maior em meio líquido.

Embora economicamente interessante, a utilização de meio líquido apresenta, frequentemente, plantas com aspecto vitrificado. Snir e Erez (1980) atribuem este fato possivelmente a uma maior absorção de nutrientes e hormônios do meio, não apenas através da base cortada do explante, mas de toda sua superfície. Grattapaglia e Machado (1990) afirma que uma das medidas adotadas para conter este processo degenerativo é justamente o incremento na concentração de ágar no meio de cultura.

Pasqualetto, Zimmerman e Fordham (1986) verificaram um decréscimo significativo na percentagem de plantas vitrificadas de macieira com o aumento na concentração de ágar no meio. Entretanto, a elevação na concentração de ágar pode resultar em um meio muito consistente, que embora seja útil para evitar a vitrificação, provoca uma inibição no desenvolvimento da planta, reduzindo a taxa de multiplicação (Murashige, 1974; Grattapaglia e Machado, 1990).

A concentração ótima para proliferação e crescimento de brotos de maçã silvestre (*Malus domestica* Borkh) ocorreu em 0,3% de ágar, sendo que em concentrações maiores este crescimento foi decrescendo. Com relação à pera (*Pyrus communis* L.), o aumento na concentração de ágar também reduziu o crescimento, mas para a proliferação dos brotos a concentração ótima foi 0,6% ou superior (Singha, 1982).

As tampas utilizadas para vedar os frascos também exercem um efeito muito grande no desenvolvimento de alguns explantes. Este efeito é devido, principalmente, a formação de um microclima dentro do frasco (Grattapaglia e Machado, 1990). As tampas de plástico (polipropileno) são as mais utilizadas nos laboratórios, porque são desenvolvidas especialmente para trabalhos em cultura de tecidos, e resistem a elevadas temperaturas, podendo ser autoclavadas sem deformação. Porém, seu elevado custo contribui para utilização de outros tipos de tampas como: papel de alumínio, algodão, metal e vitafilm^R (PVC) (Pierik, 1987)

A utilização de vitafilm^R permite uma maior penetração da luz quando comparada aos outros tipos de tampas. Além disso, há uma perda de água mais rápida do interior do frasco causando uma menor disponibilidade de água na forma gasosa, prevenindo a vitrificação e estimulando a transpiração nas plantas, evitando as necroses apicais por deficiência de elementos pouco translocáveis como o Cálcio. No entanto, McClelland e Smith (1990) verificaram que frascos selados com Vitafilm^R tinham alta condensação, e os brotos principalmente, de *Acer* e *Forsythia* eram frequentemente flácidos e vitrificados, por outro lado *Betula* apresentavam um aumento no comprimento e na densidade dos brotos. Desta maneira verifica-se que o vitafilm^R não é adequado para um bom crescimento de todas as culturas. Como exemplo, a macieira, o *Eucalyptus* e os citros têm apresentado problemas de alongamento. Este comportamento pode

estar relacionado com o acúmulo de diferentes gases em função da permeabilidade diferencial da película do vitafilme^R a cada um deles (Grattapaglia e Machado, 1990).

Segundo Lentini et al. (1988) o vitafilme^R, que é amplamente usado para selar placas de petri, tem baixa ou nenhuma permeabilidade ao etileno. Há substancial evidência que este gás pode aumentar o diâmetro do hipocótilo, inibir a expansão das folhas e emergência de brotos florais além de induzir aborto de brotos.

Os frascos devem ser bem fechados para evitar o ressecamento e a contaminação por agentes externos; por outro lado, as tampas devem permitir uma troca gasosa com o ambiente externo evitando que ocorra uma deficiência de O₂ e acúmulo de gases como CO₂ e etileno (Pierik, 1987).

Lentini et al. (1988) verificaram que frascos fechados com rolhas de espuma, algodão ou tampas de plástico não atarrachado, permitiram um desenvolvimento normal das plantas de *B. campestris*; tampas de plástico atarrachada, folha de alumínio, vitafilme^R ou rolhas de borracha as plantas não apresentaram um bom desenvolvimento.

Woltering (1986) cultivando plantas de *Gerbera jamesonii* cv. Sue Ellen com unidades de polipropileno, concluiu que um sistema de fechamento sem um absorvente de etileno causou uma elevação na concentração de etileno e CO₂, resultando numa condição prejudicial para o seu crescimento.

4.2 OBJETIVOS

O objetivo do experimento 1 foi verificar a influência dos meios de cultura semi-sólido e o meio líquido sobre o desenvolvimento de segmentos nodais de repolho.

O objetivo do experimento 2 foi verificar a influência de três tipos de tampas: (metal, vitafilme^R e plástica), sobre o desenvolvimento de segmentos nodais de repolho.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os explantes utilizados nos dois estudos foram microestacas de repolho obtidas do cultivo *in vitro* conforme descrito no capítulo 3 item 3.3.1.

As microestacas foram seccionadas em segmentos de 2,5 cm de comprimento com 4 a 5 gemas axilares. Para o experimento 1, foram colocadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 ml de meio de cultura MS suplementado com 27 mg/L de adenina, 5 mg/L de AIA, 161,5 mg/L de fosfato monobásico de sódio e 4 mg/L de Cinetina (Torres, Vecchia e Caldas, 1978), variando a consistência do meio entre meio líquido e meio semi-sólido (0,7% de ágar) (Merck). O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 1$ antes da autoclavagem a $121 \pm 1^\circ \text{C}$ por 20 minutos. Foi empregado o delineamento experimental inteiramente casualizado composto de 10 repetições, sendo cada parcela constituída por 4 tubos e 1 microestaca por tubo o qual foi fechado com tampa plástica e seus bordos protegidos com vitafilme^R.

A avaliação foi realizada aos 30 dias após a repicagem com observação dos seguintes parâmetros: número de brotos, comprimento médio de brotos, número de folhas por broto, peso da matéria fresca e peso da matéria seca.

No experimento 2 as microestacas foram colocados em frascos de 250 ml contendo 30 ml de meio de cultura MS suplementado com 27 mg/L de adenina, 5 mg/L de AIA, 161,5 mg/L de fosfato monobásico de sódio e 4 mg/L de Cinetina (Torres, Vecchia e Caldas, 1978), solidificado com 0,7% de ágar (Merck), o pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 1$ antes da

autoclavagem a $121 \pm 1^\circ \text{C}$ por 20 minutos. Os tratamentos foram variações entre três tipos de tampas (Plástica, Metal e Vitafilm^R). Foi empregado o delineamento experimental inteiramente casualizado composto de 5 repetições, sendo cada parcela constituída por 4 frascos e 2 microestaca por frasco.

A avaliação foi realizada aos 30 dias após a repicagem com observação dos seguintes parâmetros: número de brotos, comprimento de brotos, peso da matéria fresca e peso da matéria seca.

A avaliação do comprimento de brotos foi realizada medindo cada broto da base até a região da gema apical, não sendo considerado portanto o comprimento das folhas que ultrapassavam esta região.

Os experimentos foram instalados em sala de crescimento com temperatura controlada de $26 \pm 1^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) e 2500 lux de luminosidade fornecida por lâmpadas fluorescentes branca fria.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Experimento 1 - Consistência do meio de cultura

Os resultados, obtidos neste experimento, permitiu concluir (Quadro 05) que o estado físico do meio nutritivo não influenciou a micropropagação do clone 400 de repolho cultivado tanto em meio de cultura semi-sólido como em meio de cultura líquido, com utilização de ponte de papel de filtro. Já Steward (1958) citado por Murashige (1974), relata que o desenvolvimento *in vitro* de algumas espécies vegetais como *Dacus carota*, *Asparagus officinalis*,

como também orquídea, gérbera e bromélias segundo Murashige (1974), são bastante influenciadas pela consistência do meio de cultura.

QUADRO 05 - Resumo das análises de variância para número e comprimento médio de brotos, número de folhas por broto, peso de matéria fresca e de matéria seca do clone 400, cultivados em meio líquido ou semi-sólido.

Causa de Variação	GL	Quadrados médios				
		Nº de brotos	Comprimento de brotos	Nº de folhas	Peso de mat. fresca	Peso de mat. seca
Consistência	1	1,3729 ^{NS}	0,0470 ^{NS}	0,8120 ^{NS}	0,0106 ^{NS}	0,0008 ^{NS}
Resíduo	18	0,6969	0,1754	1,4870	0,2353	0,0010
C.V.(%)		28,18	28,69	16,24	57,73	48,32
Média		2,96	1,46	7,51	0,84	0,06

^{NS} Não significativo a nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Após 30 dias da repicagem obteve-se um número médio de 2,9 brotos por explante sendo que o meio semi-sólido apresentou uma média de 3,2 brotos, enquanto o meio líquido 2,6 brotos conforme Figura 19. Além disso, os brotos apresentaram uma cor verde escuro característico do clone, não sendo, portanto, verificado nenhum aspecto que pudesse ser relacionado com vitrificação, não se confirmando a hipótese de Lee, Wetzstein e Mutschler (1986), segundo o qual a utilização de meio líquido apresenta uma condição mais favorável ao surgimento de plantas vitrificadas.

Na Figura 20, pode-se verificar que não houve diferença significativa entre os dois tratamentos para número de folhas produzidas. O número de folhas é presumivelmente relacionado à taxa potencial de multiplicação, uma vez que indica o número de gemas laterais (produzidas nas axilas foliares) disponíveis como explantes.

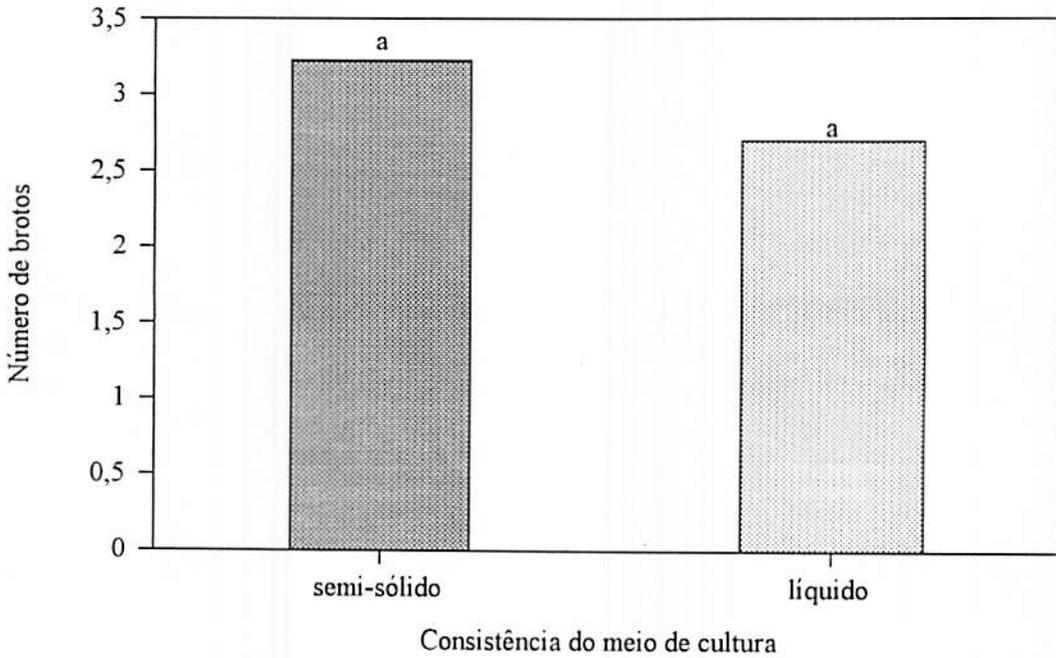


FIGURA 19 - Representação gráfica dos valores médios de número de brotos produzidos através de segmentos nodais do clone 400, em função da consistência do meio de cultura.

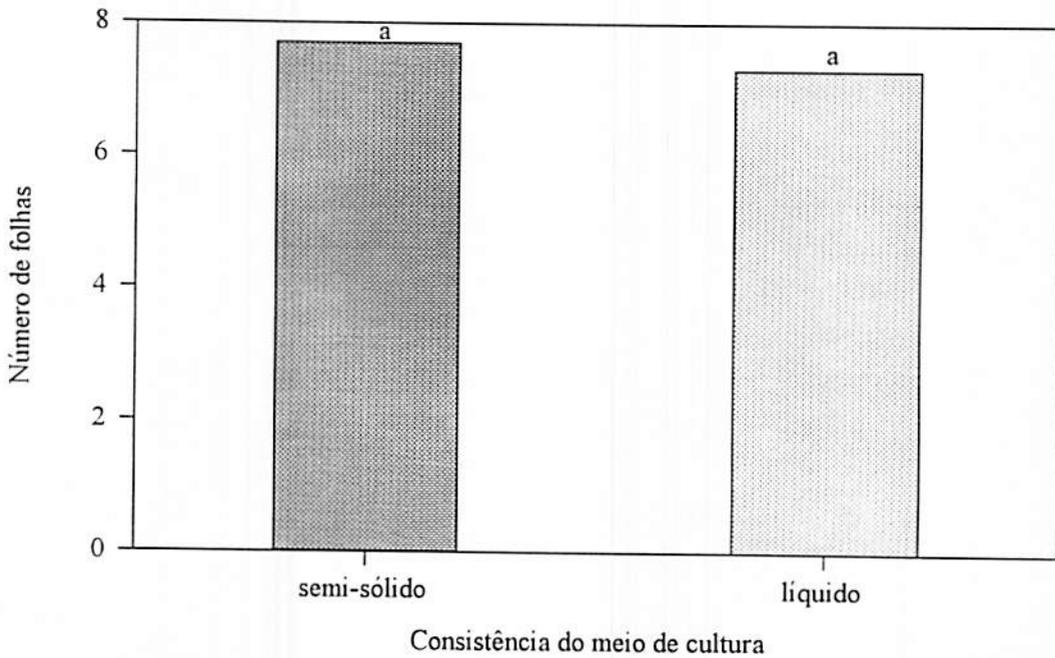


FIGURA 20 - Representação gráfica dos valores médios de número de folhas produzidas através de segmentos nodais do clone 400, em função da consistência do meio de cultura.

Não foi verificada diferença significativa para comprimento médio de brotos entre os dois tratamentos, sendo que, o comprimento médio dos brotos cultivados em meio semi-sólido foi 1,5 cm e em meio líquido de 1,4 cm (Figura 21).

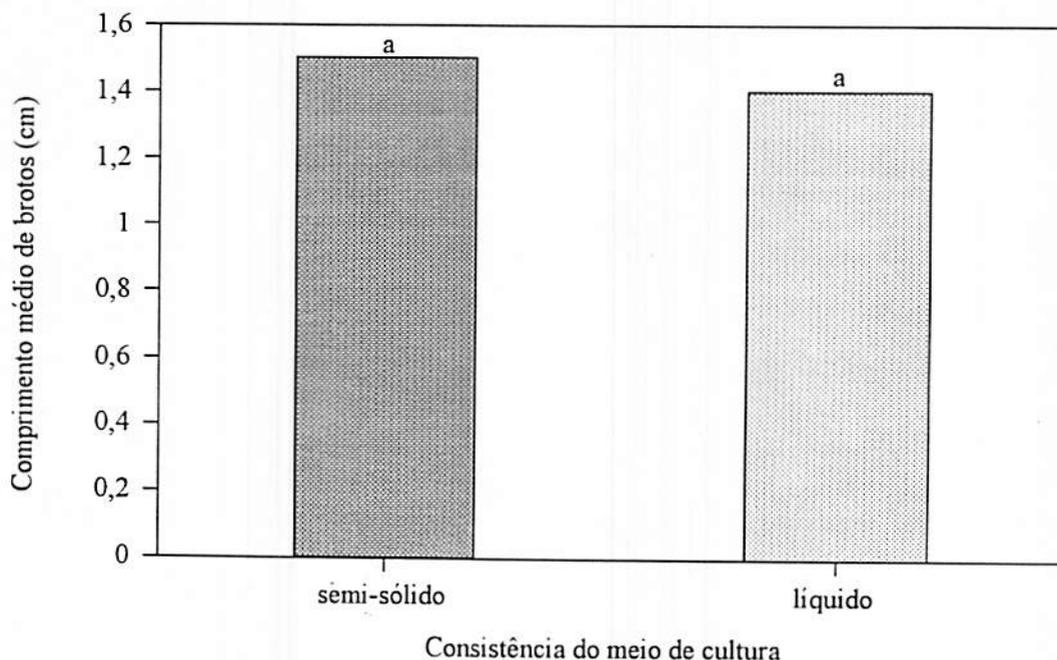


FIGURA 21 - Representação gráfica dos valores médios de comprimento de brotos produzidos através de segmentos nodais do clone 400, em função da consistência do meio de cultura.

O sistema radicular formado no meio de cultivo líquido foi mais abundante do que em meio semi-sólido, concordando com Grattapaglia e Machado (1990), os quais relataram que o sistema radicular tende a ser mais desenvolvido em meio líquido. Entretanto, estas raízes foram finas e compridas, ao contrário das obtidas no cultivo em meio semi-sólido cujas raízes eram mais curtas, com um diâmetro maior. O crescimento das raízes em meio líquido desenvolve melhor do que em meio sólido, em virtude de uma maior facilidade de trocas gasosas que ocorre entre as raízes e o meio de cultura favorecida pela utilização das 'pontes' de papel de filtro.

Os pesos de matéria fresca e de matéria seca de brotos (Figura 22 e 23) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Estes resultados foram diferentes daqueles encontrado por Heller et al. (1968) citado por Caldas, Haridasan e Ferreira (1990), onde relataram que tecidos de cenoura cultivados em meio líquido absorveram maiores quantidade de água do que em meio semi-sólido.

Segundo Caldas, Haridasan e Ferreira (1990), o meio semi-sólido tem a propriedade de impor restrições à velocidade de difusão de nutrientes em relação ao meio líquido, causando deficiência nutricional das plantas, principalmente para as espécies mais sensíveis. No entanto, não foi verificado nenhum sintoma de deficiência nutricional entre as brotações obtidas a partir das microestacas utilizadas (Figura 24).

Embora não tenha sido verificado, estatisticamente, nenhuma diferença significativa entre os dois tipos de tratamentos, observou-se que os brotos obtidos no cultivo em meio semi-sólido exibiam um aspecto melhor do que aqueles produzidos em meio líquido. Isto porque muitos brotos adventícios que surgiram na base das microestacas, cultivadas em meio líquido desenvolveram sob a ponte de papel de filtro, prejudicando o seu crescimento de forma erecta; por isso, mesmo sendo brotos aparentemente normais eles apresentaram uma forma irregular o que poderia dificultar o seu desenvolvimento.

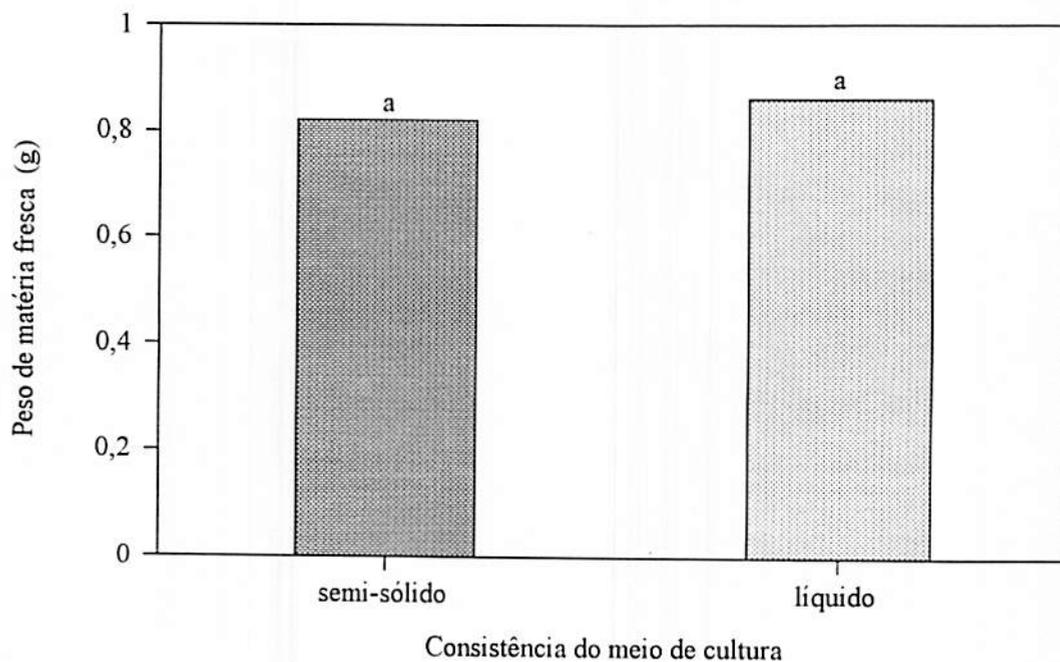


FIGURA 22 - Representação gráfica dos valores médios de peso de matéria fresca de brotos produzidos através de segmentos nodais do clone 400, em função da consistência do meio de cultura.

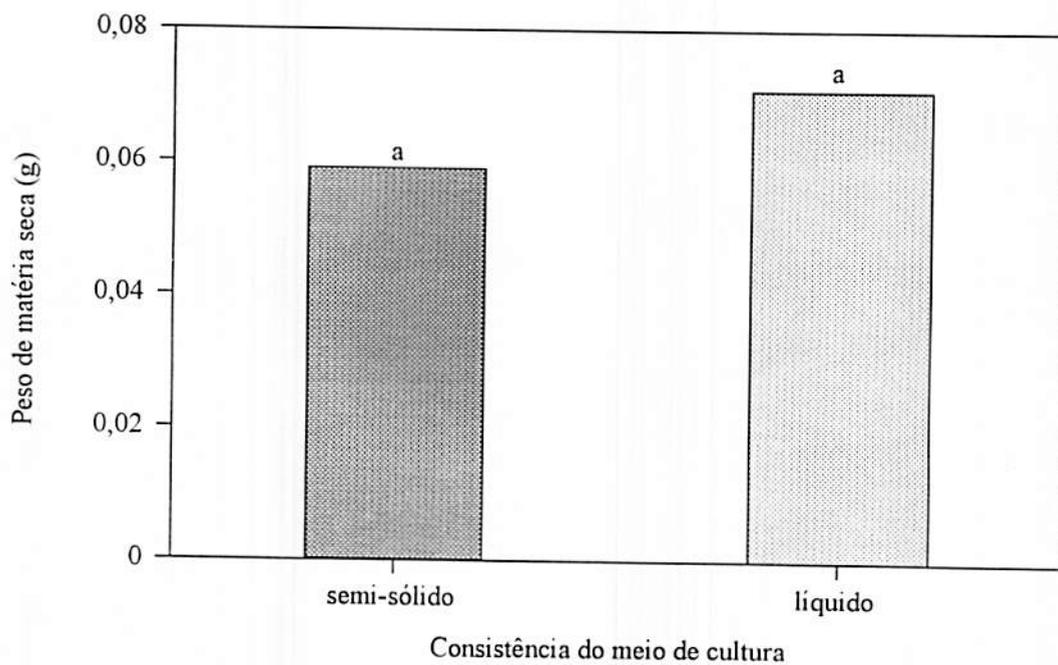


FIGURA 23 - Representação gráfica dos valores médios de peso de matéria seca de brotos produzidos através de segmentos nodais do clone 400, em função da consistência do meio de cultura.

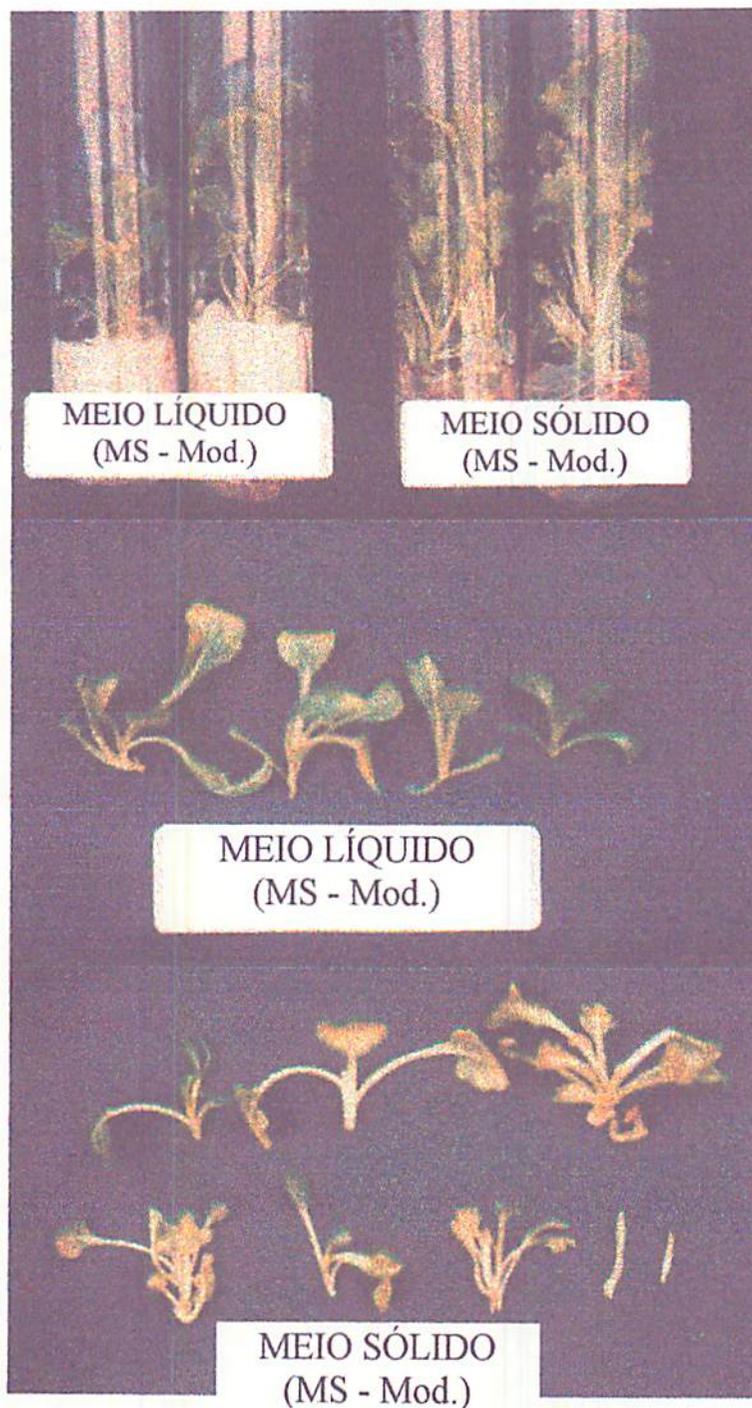


FIGURA 24 - a) Desenvolvimento de brotações do clone 400 cultivados em meio líquido e em meio sólido, b) e c) tipos de brotos utilizados para repicagem

4.4.2 Experimento 2 - Tipos de tampas

Para os tipos de tampas (Figura 25), empregadas neste experimento, os resultados apresentados (Quadro 06) mostram que as microestacas da família clonal 800, cultivadas em frasco de 250 ml fechados com tampas de metal, vitafilme^R e plástico não apresentaram diferenças significativas para número de brotos e comprimento médio de brotos, produzindo em média 4,7 brotos com 2,6 cm de comprimento médio dos brotos entre os tratamentos, após 30 dias de cultivo (Figura 26). Resultados que foram semelhantes aos encontrados por Lentini et al. (1988), utilizando tampas porosas no cultivo de *B.campestris*.

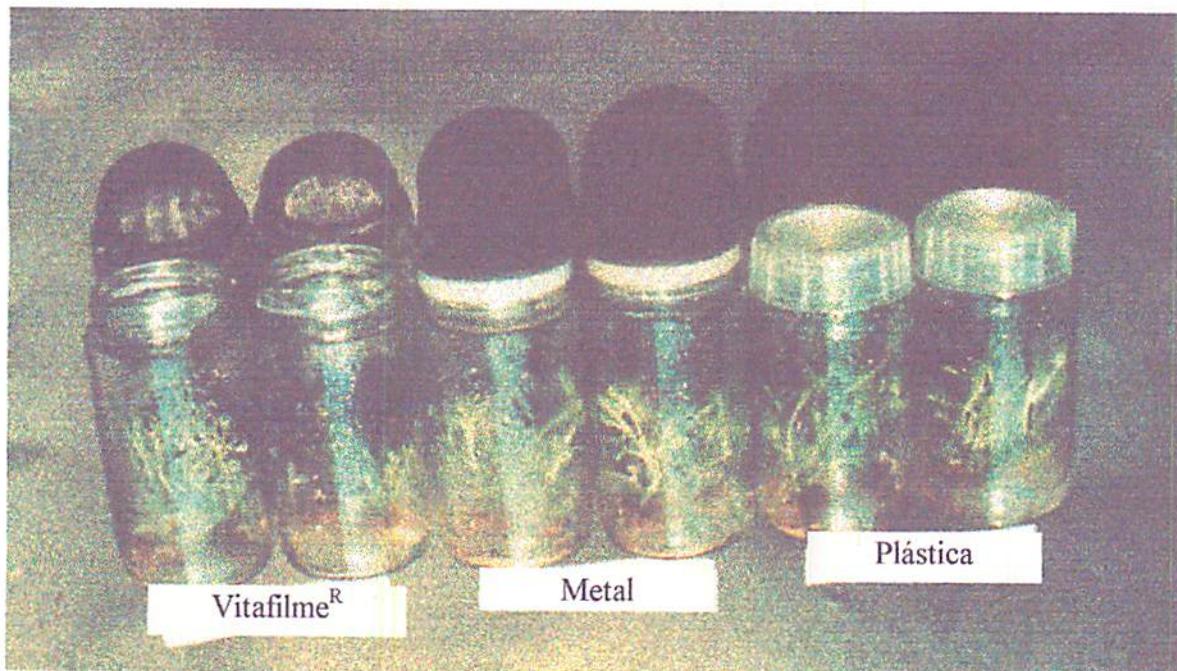


FIGURA 25 - Modelos de tampas (Vitafilme^R, Metal e Plástica) utilizadas em laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais.

QUADRO 06 - Resumo das análises de variância para número de brotos, comprimento médio de broto, peso da matéria fresca e matéria seca do clone 800 utilizando três tipos de tampas.

Causa de Variação	GL	Quadrados médios e significância			
		Número de brotos	Comprimento de brotos	Peso de mat. fresca	Peso de mat. seca
Tampas	2	0,0507 ^{NS}	0,2656 ^{NS}	0,1709*	0,0004 ^{NS}
Resíduo	12	0,2957	0,1370	0,0402	0,0005
C.V.(%)		11,55	13,81	14,35	34,53
Média		4,71	2,68	1,40	0,06

^{NS}. * Não significativo e significativo respectivamente, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

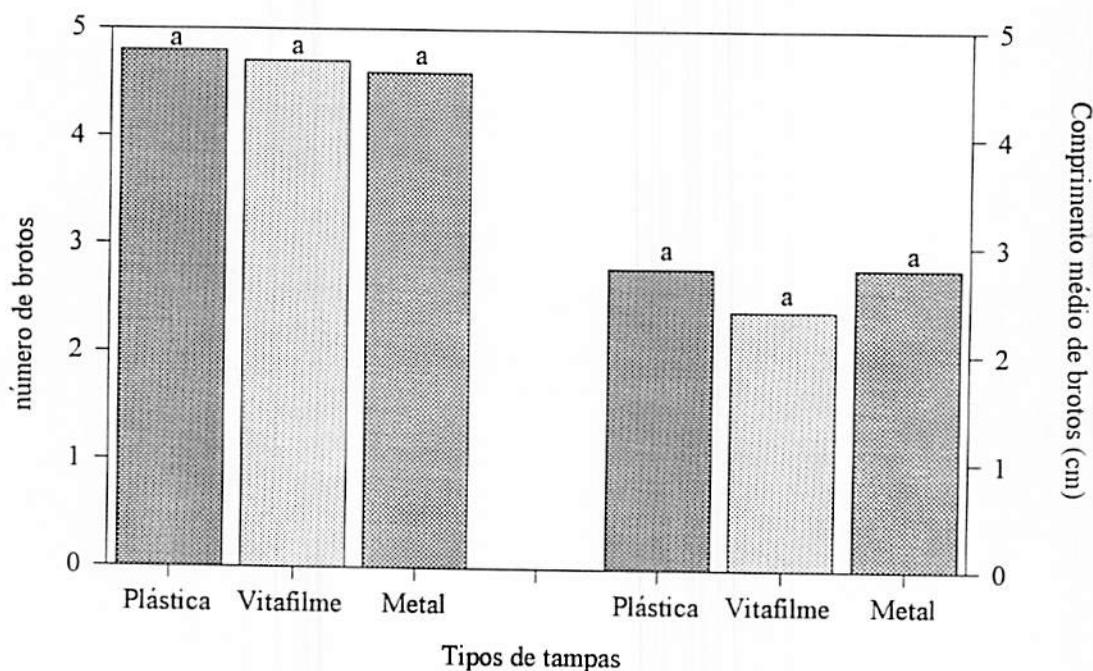


FIGURA 26 - Representação gráfica dos valores médios de número e comprimento de brotos produzidos através de segmentos nodais da família clonal 800, em função dos tipos de tampas.

Foi observado em repicagens anteriores que, quando se apertava a rosca das tampas de metal no frasco, impedindo as trocas gasosas com o meio externo, ocorriam superbrotamento e estiolamento dos brotos, em virtude do acúmulo de compostos voláteis,

(provavelmente o etileno), no interior dos frascos; entretanto estas brotações eram fracas e com aspecto vitrificado, tornando-se inviáveis para a multiplicação, pois o aumento de compostos voláteis (CO₂, etileno e etanol) no interior dos frascos pode conduzir à desordens fisiológicas, como redução da respiração, baixa atividades metabólicas além de acúmulo de alguns metabólitos tais como amino ácidos e oxolatos. Por isso, no tratamento onde se utilizaram tampas de metal, estas não foram atarrachadas na rosca do frasco, mas simplesmente apoiadas. Este procedimento permitiu que houvesse uma maior troca gasosa entre o interior e o exterior do frasco, evitando a intoxicação dos explantes como foi relatado por Pierik (1987).

As tampas plásticas são mais adaptadas ao cultivo *in vitro* devido a certas características que elas apresentam, como não possuírem rosca, e ainda terem algumas ranhuras internas que facilitam as trocas gasosas com o meio externo, estas tampas também são quase translúcidas, e permitem uma penetração de luz no interior dos frascos em quantidade intermediária quando comparada às tampas de metal e vitafilme^R, também muito usadas em laboratório.

Na avaliação do peso de matéria fresca dos brotos (Quadro 06) houve uma diferença significativa entre os tratamentos com tampas de metal e vitafilme^R, sendo que, o peso médio de matéria fresca obtido com o cultivo com tampa de metal foi superior ao peso médio obtido com a tampa de vitafilme^R, conforme pode ser visualizado na Figura 27.

Esta diferença pode estar relacionada com o fato de que as tampas de metal impedem a passagem de luz para o interior do frasco, fazendo com que toda luz seja recebida através da parede lateral do frasco, o que diminui a quantidade de luz recebida pelo explante, e reduz sua capacidade de transpiração; isto foi observado pelo excesso de condensação nas paredes dos frascos, indicando que a umidade do ar no interior do frasco tornou-se mais elevada,

diminuindo a transpiração e colaborando para que os tecidos armazenassem maior quantidade de água.

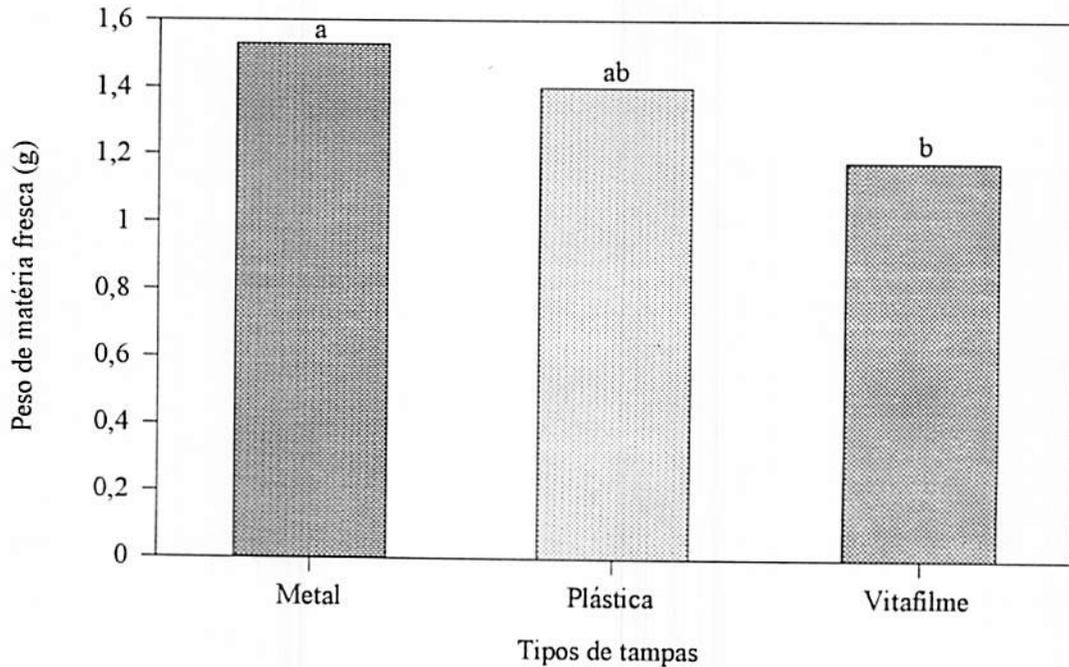


FIGURA 27 - Representação gráfica dos valores médios de peso de matéria fresca dos brotos produzidos através de segmentos nodais da família clonal 800, em função dos tipos de tampas.

Já os frascos tampados com vitafilme^R permitem maior penetração de luz, com isso a transpiração é mais elevada, como foi observado pela ausência de condensação nas paredes internas dos frascos; o ambiente interno tornou-se assim mais seco e os brotos não armazenaram tanta água nos seus tecidos. Foi observado, também, uma redução de até 50% no volume inicial de meio de cultura 30 dias após a instalação do experimento. Estes resultados diferem daqueles obtidos por Sha, MacCown e Peterson (1985), cujo o uso de vitafilme^R para fechar os frascos de batata (*Solanum tuberosum* L.) resultou em morte do ápice, diminuição de peso e aumento de brotoções.

Na análise do peso da matéria seca não foi verificado nenhuma diferença significativa entre os tratamentos (Figura 28).

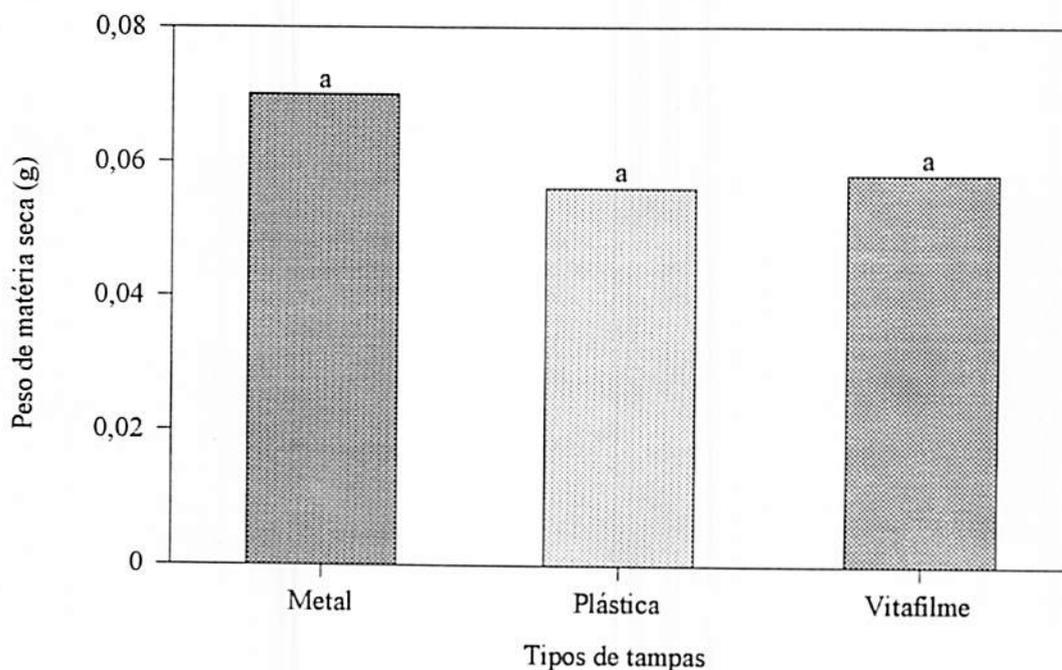


FIGURA 28 - Representação gráfica dos valores médios de peso de matéria seca dos brotos produzidos através de segmentos nodais da família clonal 800, em função dos tipos de tampas.

Na avaliação do sistema radicular, os resultados (Quadro 07 e Figura 29) mostraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos para número de raízes. Mas, para o comprimento médio as raízes produzidas no cultivo com tampas de metal e plástica, estas foram estatisticamente superiores a nível de 5% em relação as raízes produzidas com o vitafilme^R.

O vitafilme^R por permitir uma maior evaporação, e reduzindo o volume inicial do meio de cultura em até 50%, prejudicou o desenvolvimento das raízes. Este crescimento pode ter sido afetado, por uma maior concentração de sais devido à evaporação de água do meio de cultura. Por outro lado, a tampa de metal que tem maior resistência a perda de água, conservou

um volume maior de meio o que permitiu o desenvolvimento normal das raízes não causando toxidez as raízes para o seu crescimento (Figura 30).

QUADRO 07 - Resumo das análises de variância para número de raiz, comprimento médio de raiz, peso da matéria fresca e da matéria seca do clone 800 utilizando três tipos de tampas.

Causa de Variação	GL	Quadrados médios e significância			
		Número de raízes	Comprimento de raízes	Peso de mat. fresca	Peso de mat. seca
Tampas	2	18,6167 ^{NS}	1,4127 ^{**}	0,0022 ^{NS}	0,0000320 [*]
Resíduo	12	38,9167	0,1677	0,0035	0,0000056
C.V.(%)		23,13	10,91	17,97	7,58
Média		26,97	3,75	0,33	0,03

*, ** Significativo ao nível de 5% e 1%, respectivamente de probabilidade, pelo teste F.

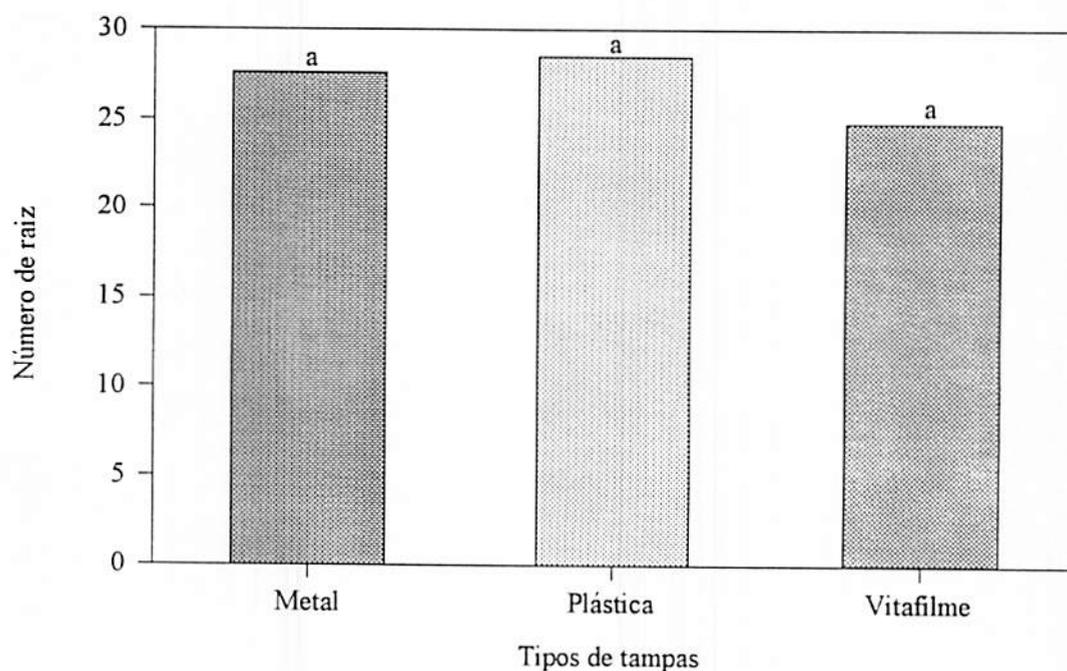


FIGURA 29 - Representação gráfica de valores médios de número de raiz produzida através de segmentos nodais da família clonal 800, em função dos tipos de tampas.

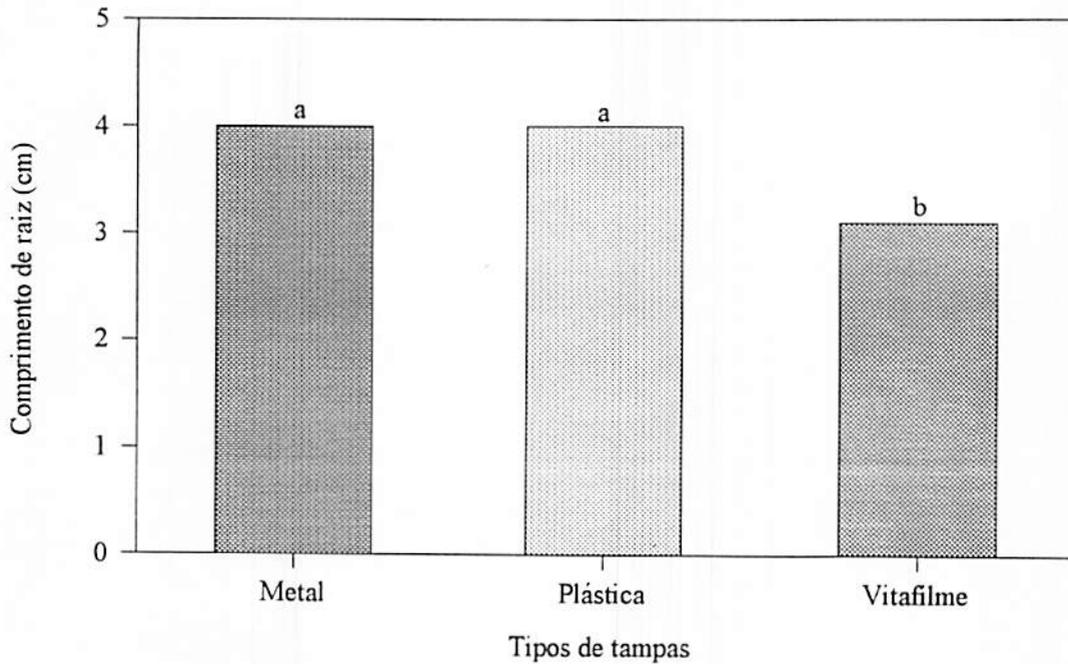


FIGURA 30 - Representação gráfica de valores médios de comprimento de raiz produzidas através de segmentos nodais da família clonal 800, em função dos tipos de tampas.

O peso da matéria fresca não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, embora o tamanho das raízes tenham sido menores quando cultivadas com tampas de vitafilme^R, entretanto, foi observado que estas raízes tiveram um diâmetro maior, acumulando maiores quantidades de água nos seus tecidos, compensando o peso de matéria fresca quando comparado as raízes finas e compridas obtidas com tampas de metal e plástica. Entre as tampas de metal e plástica não houve diferença tanto para peso de matéria fresca como de matéria seca (Figura 31 e 32). Comparando as tampas de plástico e vitafilme^R, o peso de matéria seca de raízes cultivadas com tampas de plástico foi inferior, pois apesar de serem maiores em comprimento elas eram muito finas.

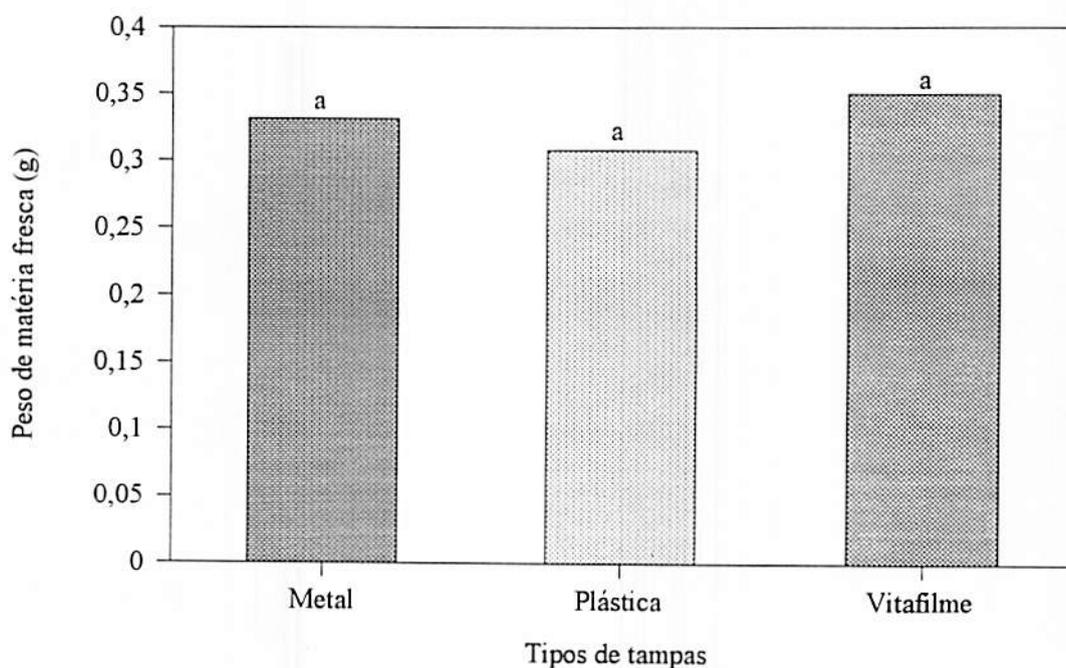


FIGURA 31 - Representação gráfica de valores médios de peso de matéria fresca de raiz produzida através de segmentos nodais da família clonal 800, em função dos tipos de tampas.

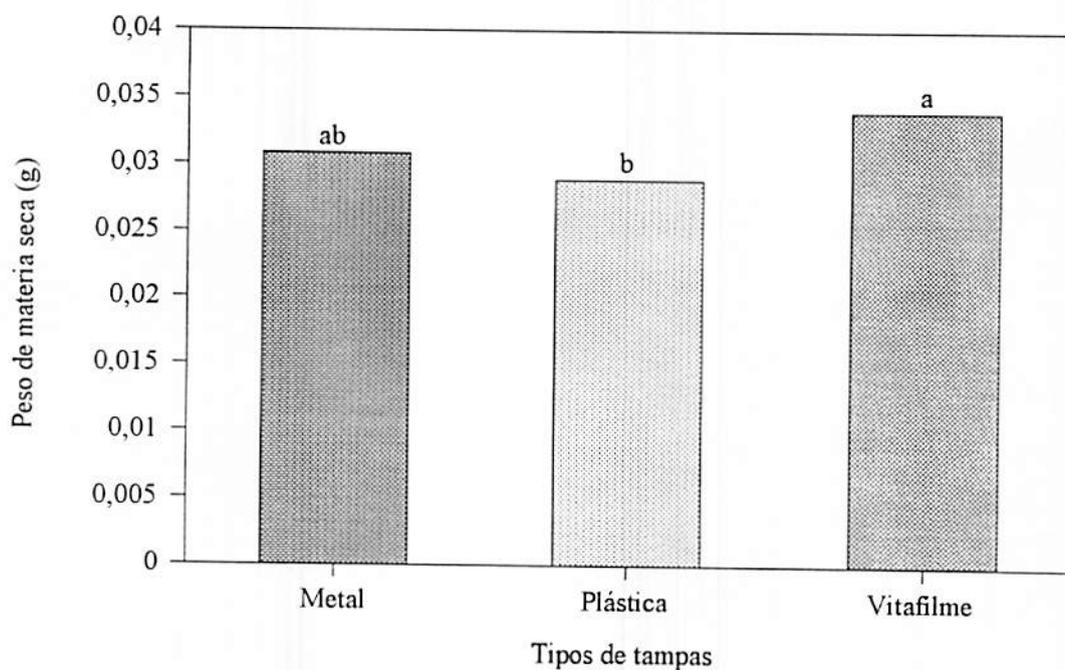


FIGURA 32 - Representação gráfica de valores médios de peso de matéria seca de raiz produzida através de segmentos nodais da família clonal 800, em função dos tipos de tampas.

4.5 CONCLUSÕES

Experimento 1

A utilização de meios de cultura líquido ou semi-sólido não apresentou diferenças na multiplicação de repolho *in vitro*. Entretanto, a qualidade dos brotos obtidos em meio semi-sólido geralmente foi superior ao meio líquido, pois a 'ponte' de papel de filtro utilizada para sustentar e permitir uma maior aeração da microestaca, impediu o crescimento de alguns brotos que surgiram sob o papel de filtro. Desta forma considera-se a utilização de meios semi-sólido mais apropriado para a propagação do repolho *in vitro*.

Experimento 2

Para a multiplicação do repolho, pode-se utilizar tanto tampas de metal, vitafilme^R e plástico sem afetar o número e a qualidade dos brotos produzidos. No entanto, quando utilizar tampas de metal, estas não deverão ser hermeticamente fechadas, sob pena de evitarem as trocas gasosas necessárias ao bom desenvolvimento dos explantes. No caso de se utilizar o vitafilme^R, a adição de um volume maior de meio de cultura por frasco é necessária para evitar o ressecamento do meio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIONDI, S.; THORPE, T.A. Requeriments for a Tissue Culture Facility. In: THORPE, T.A.(ed.) **Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture**. Canada: University Calgary, 1981. p.1-20.

- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S.(eds.) *Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.37-69.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C; CALDAS, L.S. (eds.) *Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-169.
- GUPTA,P.K.; MASCARENHAS, A.F.; JOGANNATHAN, V. Tissue Cultures of forest trees - clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook, by Tissue Culture. *Plant Science Letters*, Limerick, v.20, p.195-201, 1981.
- KITTO, S.L.; YOUNG, M.J. *In vitro* propagation of Carrizo Citrange. *HortScience*, Alexandria, v.16, p.305-306, 1981.
- LEE, N.; WETZSTEIN, H.Y.; SOMMER, H.E. The effect of agar vs. liquid medium on rooting in tissue-cultured Sweetgum. *HortScience*, Alexandria, v.21, n.2, p.317-318, 1986.
- LENTINI, Z.;MUSSELL, H.;MUTSCHLER, M.A.e EARLE, E.D. Ethylene Generation and Reversal of Ethylene Effects During Development *in vitro* of Rapid-cycling *Brassica campestris* L. *Plant Science*, Ireland, v.54, p.75-81, 1988.
- McCLELLAND, M.T.; SMITH, M.A.L. Vessel type, Closure, and Explant Orientation *in vitro* Performance of Five Woody Species. *HortScience*, Alexandria, v.25 n.7, p.797-800, 1990.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through Tissue Cultures. *Annual Review Plant Physiology*, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- PASQUALETTO, P.L.; ZIMMERMAN, R. H.; FORDHAM, I. Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of 'Gala' apple *in vitro*. *Journal American Society Horticultural Science*, Mount, v.11, p.976-980, 1986.
- PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishing, 1987, p.83-85.
- RODRIGUES, B.M. Micropropagação e bulbificação *in vitro* de cebola (*Allium cepa* L.) Lavras: ESAL, 1994. 109p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- ROMBERGER, J.A.; TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. *American Journal Botany*, Columbus, v.58, p.131-140, 1971.
- SHA, L.; McCOWN, B.H.; PETERSON, L.A. Occurrence and Cause of Shoot-tip Necrose in Shoot Cultures. *Journal American Society Horticultural Science*, Mount, v.5, n.110 p.631-634, 1985.

- SINGHA, S. Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* spp. 'Almey' and *Pyrus communis* 'Seckel'. **Journal American Society Horticultural Science**, Mount, v.107, p.657-660, 1982.
- SNIR, I.; EREZ, A. *In vitro* propagation of Malling Merton apple rootstocks. **HortScience**, v.15, p.597-598, 1980.
- TORRES, A.C.; VECCHIA, P.T.; CALDAS, L.S. Propagação vegetativa de couve-flor (*Brassica oleracea* var. botrytis subvar. cauliflora DC.) *in vitro* visando ao melhoramento de cultivares de verão. **Revista Ceres, Viçosa**, v.25, p.602-609, 1978.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este trabalho de propagação de repolho teve como objetivo desenvolver uma metodologia de propagação *in vivo* e *in vitro* de clones de difícil multiplicação, utilizadas como parentais auto-incompatíveis para obtenção de sementes híbridas.

Para atacar estes problemas, utilizaram-se inicialmente microestacas de clones de difícil enraizamento e de fácil enraizamento. As estacas de difícil enraizamento desenvolvem gemas rudimentares ou, às vezes, inexistentes na base da folha, conseqüentemente o desenvolvimento das brotações torna-se mais difícil ou até mesmo impossível, pois acredita-se que os folíolos ou primórdios foliares são considerados fontes de hormônios naturais na planta, os quais são utilizados na formação do sistema radicular. Neste trabalho, observou-se a necessidade do estímulo externo através de reguladores de crescimento e substâncias que auxiliam no enraizamento para a indução de um sistema radicular mais completo, o que foi obtido com o tratamento a 125 mg/L de AIB, 100 mg/L de Ácido Bórico e 20g/l de sacarose. A metodologia para indução de raízes nos clones de difícil enraizamento foi alcançada com bastante sucesso. Por outro lado foi observado também que as microestacas de difícil enraizamento que apresentaram gemas axilares já formadas tinham um desenvolvimento mais fácil.

Outro ponto interessante, observado neste trabalho, foi a necessidade da utilização de reguladores de crescimento para induzir o desenvolvimento de gema nas microestacas que não

apresentam estas brotações visíveis nas axilas foliares. Tentou-se utilizar BAP e GA na indução e no crescimento destas gemas, mas não obteve-se bons resultados. Portanto, há necessidade de maiores estudos com aplicação de outros reguladores de crescimento bem como concentrações mais efetivas, capaz de induzir o crescimento das gemas nestas estacas.

Outra forma de estudo utilizada, foi a propagação *in vitro* em larga escala dos clones de difícil multiplicação. Neste trabalho, observou-se pequena indução de brotações nestes clones, com o regulador de crescimento mais usado para multiplicação, ou seja, o BAP, indicando a necessidade da utilização de reguladores de crescimento mais efetivos na indução de novos brotos. Um novo regulador, o Thidiazuron (TDZ), foi bastante efetivo na multiplicação das brotações adventícias. Foram observados um grande número de brotos com a utilização de 0,1 a 3,0 mg/L desse novo regulador de crescimento. A utilização de dosagens bastante reduzidas, se deve ao fato de se obter brotações de melhor qualidade, ou seja, com os folíolos maiores. Todas as brotações conseguidas na multiplicação, utilizando TDZ, quando colocadas em meio de cultura contendo apenas os sais, foram capazes de desenvolverem-se normalmente em plântulas.

Com base nas informações geradas nesse trabalho, acredita-se que a micropropagação de clones de repolho de difícil multiplicação seja viável, utilizando-se, principalmente, a cultura de tecidos como uma ferramenta no processo de multiplicação e manutenção desses clones.