

**[*ETLIGERA ELATIOR* (JACK) R. M. SMITH]:
PROPAGAÇÃO *IN VITRO*, ANATOMIA E
OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS**

JESSÉ MARQUES DA SILVA JÚNIOR

2007

JESSÉ MARQUES DA SILVA JÚNIOR

[*ETLIGERA ELATIOR* (JACK) R. M. SMITH]: PROPAGAÇÃO *IN VITRO*, ANATOMIA E OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS

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

Orientador
Prof. Dr. Renato Paiva

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

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

Silva Júnior, Jessé Marques.

[*Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith]: propagação *in vitro*, anatomia e obtenção de protoplastos / Jessé Marques da Silva Júnior. -- Lavras: UFLA, 2007. 104 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2007.

Orientador: Renato Paiva.

Bibliografia.

1. *Etiligera elatior*. 2. Protoplastos. 3. Zingiberaceae. 4. Cultivo *in vitro* 5. Planta ornamental. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 584.2104165

JESSÉ MARQUES DA SILVA JÚNIOR

[*ETLIGERA ELATIOR* (JACK) R. M. SMITH]: PROPAGAÇÃO *IN VITRO*, ANATOMIA E OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS

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

APROVADA em 6 de agosto de 2007

Prof. Dr. Wagner Campos Otoni

UFV

Prof. Dr. Evaristo Mauro Castro

UFLA

Dra. Raírys Cravo Nogueira

UFLA

Prof. Dr. Renato Paiva, PhD
UFLA
(Orientador)

Lavras
Minas Gerais – Brasil

A minha família, pelo apoio, compreensão, confiança e amor, pois foi por meio dela que me tornei um homem digno.

OFEREÇO

DEDICO

A minha querida mãe, Roeslene de Lima Marques da Silva e a minha irmã, Gressiely de Lima Marques da Silva, por todo amor, carinho e dedicação. Sem elas, seria impossível a realização deste sonho.

MENSAGEM

*Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis,
as pedras do caminho se tornam montanhas
os fracassos se transformam em golpes fatais,
Mas, se você tiver grandes sonhos...
seus erros produzirão crescimento,
seus desafios produzirão oportunidades,
seus medos produzirão coragem.*

POR ISSO NUNCA DESISTA DOS SEUS SONHOS.

AUGUSTO CURY

(Trecho do livro “Nunca desista de seus sonhos”)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pelo dom da vida, pois tenho certeza absoluta de que a força que nos move, que nos impulsiona e nos dá a certeza de onde queremos chegar vem DELE.

As minhas pérolas, Roeslene de Lima Marques da Silva e Gressiely de Limas Marques da Silva.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Renato Paiva, que acreditou em mim e me deu a oportunidade de me tornar Mestre.

Aos membros da banca examinadora: professores doutores Renato Paiva, Wagner Campos Otoni e Evaristo Mauro Castro e Dra. Raírys Cravo Nogueira.

À Universidade Federal de Viçosa, em nome do Professor Wagner Campos Otoni, pelo treinamento e condução dos experimentos com protoplastos.

Ao professor Eurico Eduardo Pinto de Lemos, da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), que gentilmente forneceu as plântulas de bastão-do-imperador *in vitro* e as enzimas para isolamento de protoplastos. Muito obrigado.

À Professora Janice Guedes de Cavalho, pelas orientações no experimento de nutrição e fornecimento das mudas de bastão-do-imperador.

Ao biólogo D'Artagnan, que me ajudou durante todo o período do mestrado, nos mais diversos trabalhos.

A todos os professores da UFLA, pelos conhecimentos transmitidos durante o curso.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos: Raírys, Vanessa, Fernanda, Tina, Marcelo Padovani, Cristiano, Rodrigo, Gabriela, Marcelo Rodrigues, Luciano, Diogo, Daiane, Cleilton e Stephania, pela colaboração e amizade.

Aos funcionários técnico-administrativos: Joel, Lena, Evaristo, Izonel, Barrinha e Odorêncio, pelo auxílio e amizade.

Ao meu pai, Jessé Marques da Silva, pelo apoio quando sai de Maceió.

A Thaisa que, em tão pouco tempo conseguiu me conquistar e tem me proporcionado momentos inesquecíveis.

Aos meus queridos avós, Cícero Antônio de Lima e Rosália Vieira de Lima (*in memoriam*); as minhas tias Rosineide Vieira de Lima e Roseane Vieira de Lima e aos meus tios Roberto Carlos Vieira de Lima e Cícero Antônio de Lima Filho, o meu eterno obrigado por tudo.

Ao grande amigo e irmão Vanderley Borges, pela amizade e incentivo nas horas mais difíceis, obrigado.

As minhas queridas amigas Edvânia e Karina, pela sincera amizade e por todos os momentos felizes que me proporcionaram.

A todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

JESSÉ MARQUES DA SILVA JÚNIOR, filho de Roeslene de Lima Marques da Silva e Jessé Marques da Silva, nasceu em 24 de fevereiro de 1982, em Maceió, Alagoas. Coursou o ensino fundamental no Colégio Estefânia Teixeira Barbosa até 1994 e, do ano seguinte até 2000, estudou no Colégio de Santa Teresinha, onde concluiu o ensino médio. Em março de 2001, iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal de Alagoas (UFAL), concluindo-o em fevereiro de 2006. Durante esse período foi bolsista de iniciação científica (PIBIC) pelo CNPq, sob as orientações dos professores Antônio Valeriano P. dos Santos, Eurico Eduardo P. Lemos, Cícero Eduardo Ramalho Neto e Edna Peixoto da Rocha Amorim e desenvolveu projetos de pesquisa no setor de Fitotecnia e Fitossanidade (FIT). Em março de 2006, iniciou o mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal na UFLA, concluindo-o em agosto de 2007.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO GERAL	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Descrição da espécie.....	4
2.2 Importância das Zingiberaceae.....	6
2.3 Variedades.....	6
2.4 Doenças em Zingiberaceae.....	7
2.5 Cultura de tecidos em plantas ornamentais.....	7
2.5.1 Micropropagação.....	7
2.5.2 Protoplastos em plantas ornamentais.....	11
2.6 Aclimatização.....	15
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO 2 – MULTIPLICAÇÃO DE BASTÃO-DO-IMPERADOR IN VITRO	23
1 RESUMO.....	23
2 ABSTRACT.....	24
3 INTRODUÇÃO.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Local de execução dos experimentos.....	28
4.1.1 Obtenção dos explantes.....	28
4.2 Efeito de concentrações de BAP sobre a taxa de multiplicação <i>in vitro</i> ..	29
4.3 Efeito de níveis de BAP e ANA sobre a indução de brotações múltiplas e alongamento <i>in vitro</i>	30
4.4 Efeitos das concentrações de nitrato de amônio e uréia na multiplicação <i>in vitro</i>	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Efeito de concentrações de BAP sobre a taxa de multiplicação <i>in vitro</i> ..	32
5.2 Efeito de níveis de BAP e ANA sobre a indução de brotações múltiplas e alongamento <i>in vitro</i>	36
5.3 Efeitos das concentrações de nitrato de amônio e uréia na multiplicação <i>in vitro</i>	41
6 CONCLUSÕES.....	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
CAPÍTULO 3- ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS DE BASTÃO- DO-IMPERADOR	50

1 RESUMO.....	50
2 ABSTRACT.....	51
3 INTRODUÇÃO.....	52
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
4.1 Material vegetal.....	54
4.2 Isolamento de protoplastos.....	55
4.2.1 Isolamento de protoplastos a partir do mesofilo de plântulas <i>in vitro</i> ...	55
4.2.2 Isolamento de protoplastos a partir de pseudocaules de plântulas <i>in vitro</i>	55
4.2.3 Isolamento de protoplastos a partir do mesofilo de plantas provenientes do cultivo hidropônico.....	56
4.3 Purificação.....	58
4.4 Avaliação das combinações enzimáticas no isolamento de protoplastos em diferentes tempos de incubação.....	58
4.5 Avaliação dos diâmetros de protoplastos isolados a partir de diferentes tecidos vegetais	59
4.6 Avaliação da eficiência do sistema estacionário ou em rotação no isolamento de protoplastos.....	59
4.7 Avaliação de concentrações de manitol no rendimento de protoplastos.....	60
4.8 Avaliação de concentrações de manitol na viabilidade de protoplastos...	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1 Avaliação das combinações enzimáticas no isolamento de protoplastos em diferentes tempos de incubação	61
5.2 Avaliação dos diâmetros de protoplastos isolados a partir de diferentes tecidos vegetais.....	64
5.3 Avaliação da eficiência do sistema estacionário ou em rotação no isolamento de protoplastos	64
5.4 Avaliação de concentrações de manitol no rendimento de protoplastos.....	67
5.5 Avaliação de concentrações de manitol na viabilidade de protoplastos....	68
6 CONCLUSÕES.....	70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
CAPÍTULO 4-ACLI MATIZAÇÃO E ASPECTOS ANATÔMICOS DE BASTÃO-DO-IMPERADOR UTILIZANDO DIFERENTES SOLUÇÕES NUTRITIVAS.....	73
1 RESUMO.....	73
2 ABSTRACT.....	75
3 INTRODUÇÃO.....	77
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	80
4.1 Material vegetal.....	80
4.2 Aclimatização <i>ex vitro</i>	80

4.3 Estudos anatômicos.....	81
4.4 Descrição dos tratamentos	82
4.5 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	82
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
5.1 Aclimatização <i>ex vitro</i>	83
5.2 Plasticidade anatômica de folhas.....	86
5.3 Densidade estomática.....	96
6 CONCLUSÕES.....	101
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

RESUMO GERAL

SILVA JÚNIOR, Jessé Marques. [*Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith]: **propagação *in vitro*, anatomia e obtenção de protoplastos**. 2007. 104p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A floricultura tropical é uma atividade em ascensão no Brasil e no mundo, destacando-se como um agronegócio gerador de renda, fixador de mão-de-obra no campo e adequado como cultura alternativa para pequenos produtores. No Brasil, existem grandes plantações de flores tropicais, especialmente na região da mata úmida do Nordeste, com destaque para os estados de Pernambuco e Alagoas, que já exportam suas flores para outros estados brasileiros e também para Holanda, Portugal, Itália, França e Grécia. A propagação de [*Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith] é, basicamente, por divisão de touceiras rizomatosas e sementes. Na propagação vegetativa tradicional existe a preocupação de disseminação de doenças fitopatogênicas na comercialização desse material vegetal, principalmente quando são destinados à produção comercial em larga escala, além de prejudicar a qualidade do material colhido. O objetivo da realização deste trabalho foi analisar aspectos da multiplicação *in vitro*, verificar a eficiência de soluções enzimáticas no isolamento de protoplastos e analisar aspectos anatômicos durante a aclimatização. Os resultados permitem afirmar que a espécie *E. elatior* tem grande potencial para micropropagação em larga escala. Quando se adicionou BAP ($3,0 \text{ mg L}^{-1}$), obtiveram-se, em média, 9 brotações por propágulo, ao final de 90 dias de subcultivos. A interação entre BAP ($3,0 \text{ mg L}^{-1}$) x ANA, a partir de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, foi significativa para número e comprimento de brotações e raízes. No experimento de substituição de nitrato de amônio por uréia, o uso de 50% de uréia é indicado para a micropropagação de *E. elatior*, por proporcionar, em todas as variáveis analisadas, uma perda média de 20%, quando comparada ao meio considerado padrão para este trabalho. Para o isolamento de protoplastos de *E. elatior*, a melhor combinação enzimática foi a E (3% de Cellulase “onozuka” R-10 + 2% de Meicelase + 1% de Driselase + 1% de Dextran), com um rendimento de $22,0 \times 10^5$ protoplastos/grama de matéria fresca. A melhor concentração de manitol foi 0,6M, a qual proporcionou uma maior viabilidade dos protoplastos 96%. O melhor sistema para isolamento de protoplastos de *E. elatior* foi de 40 rpm e no escuro. O explante que proporcionou protoplastos altamente viáveis e com maior rendimento foi de mesofilo de folhas obtidas *in vitro*. Durante a aclimatização, a solução nutritiva que proporcionou melhor desempenho no desenvolvimento das plantas foi à solução MS, a 35% de sua força iônica.

*Comitê de orientação: Ranato Paiva, PhD (Orientador), Dr. Wagner Campos Otoni (Co-orientador); Dr^a. Patricia Duarte e Oliveira Paiva (Co- orientador).

2 ABSTRACT

SILVA-JÚNIOR, Jessé Marques. *Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith: *in vitro* propagation, anatomy and obtation of protoplasts. 2007. 104p. Dissertation) (Master in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The tropical floriculture is an increasing activity in Brazil and in the world and has been considered as a lucrative business, maintaining and an alternative crop production small producers work labor in the field. In Brazil there are fields of tropical flowers, especially in the region of the Northeast wet forest of Pernambuco and Alagoas states which already export its flowers to other Brazilian states and also to the Netherlands, Portugal, Italy, France and Greece. The propagation of *Elatior Eligera* (Jack) R. M. Smith occurs basically by rhizome division and seeds. In the traditional vegetative propagation there is a concern of diseases dissemination during the commercialization of this plant material specially they are used for commercial production on a large scale, in addition to injurius aming. The objective of this work was to study aspects of the multiplication *in vitro* in oder to verify the efficiency of enzymatic solutions in the isolation of protoplasts and to analyze anatomical aspects during the acclimatization process. The results showed that *E. elatior* presents a high potential for micropropagation on a large scale. Using 3.0mg L⁻¹ BAP, an average 9 shoots/ explant was obtained at the end of 90 days of sub-cultivation. The interaction between 3.0 mg L⁻¹ BAP and NAA concentration higher 0.5 mg L⁻¹ was significant for number and length of shoots and roots. The use of 50% urea replacing ammonium nitrate, for provided in all the analyzed variables an average loss of 20%, when compared with the considered standard medium. The best enzymatic combination for the isolation of protoplasts was the use of 3% Cellulase onozuka R-10 + 2% Meicelase + 1% Driselase + 1% Dextran, presenting a yield of 22.0x10⁵ protoplasts /gram of fresh matter. The best concentration of manitol was 0.6M, which provided 96% protoplast viability. The best system for isolation of *E. elatior* protoplasts was the use of 40 rpm in the dark. The explants that provided viable protoplasts with a higher yield were the *in vitro* mesophyll leaves. During the acclimatization, the use of MS nutritional solution with 35% of its ionic strenght provided the best performance during plant development.

* Guidance Committee: Ranato Paiva, PhD (Adviser), Dr. Wagner Campos Otoni (Co-Adviser); Dr^a. Patricia Duarte de Oliveira Paiva (Co- Adviser).

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

O mercado mundial de flores vem apresentando crescimento anual de 10% desde a década de 1990, tornando-se um dos segmentos econômicos de grande importância para a Organização Mundial do Comércio. Calcula-se que, atualmente, a área destinada ao cultivo de flores em todo o mundo seja de 190.000 hectares. As flores e plantas ornamentais, produtos que podem ser considerados como supérfluos, movimentam, mundialmente, cerca de 49 bilhões de dólares, desde a fase de produção até a comercialização (Desenvolvimento..., 2007).

Em 2005, as exportações brasileiras do segmento de flores e plantas ornamentais somaram US\$ 23,5 milhões, superando em 21% os resultados obtidos no ano de 2003, confirmando todos os prognósticos sobre a performance do setor exportador da floricultura brasileira (Junqueira & Peetz, 2007). Ainda segundo os mesmos autores, o setor de mudas de plantas ornamentais exportou os maiores valores, acumulando, no ano, vendas da ordem de US\$ 11 milhões, representando 48,5% do valor total exportado pela floricultura do país. No período de janeiro a dezembro de 2004, o setor chegou a comercializar internacionalmente 18% a mais do que no mesmo período de 2003, atestando o elevado potencial exportador nacional. Os maiores valores exportados tiveram como destino a Holanda, com 45% do total e um crescimento de 9% sobre o mesmo período de 2003. Os demais destinos que lhe seguiram, em importância econômica, foram Itália (16%), EUA (10%), Japão (10%), Reino Unido (4%), Dinamarca (3%), Bélgica (3%) e Alemanha (2%), além de outros treze países onde as mudas brasileiras de flores já estão presentes.

A floricultura tropical é uma atividade em ascensão no Brasil e no mundo, destacando-se como um agronegócio gerador de renda, fixador de mão-

de-obra no campo e adequado como cultura alternativa para pequenos produtores (Lins & Coelho, 2004). No Brasil existem grandes plantações de flores tropicais, especialmente na região da mata úmida do Nordeste, com destaque para os estados de Pernambuco e Alagoas, que já comercializam suas flores em outros estados brasileiros (Loges et al., 2005) e também exportam para Holanda (maior produtor mundial de flores), Portugal, Itália, França e Grécia.

O Nordeste brasileiro, situado próximo ao Equador, possui clima quente, com pequena variação no decorrer do ano e forte luminosidade. Apesar da grande extensão de clima semi-árido, dispõe de regiões com condições que possibilitam o cultivo de numerosas espécies ornamentais, tanto em campo aberto como sob proteção de casa de vegetação, viveiros ou estufas. A partir da última década do século XX, a floricultura na região Nordeste tem apresentado acentuado desenvolvimento. O mercado consumidor regional, antes abastecido, quase que totalmente pela produção de outras regiões tradicionalmente produtoras de flores de clima temperado, passou a ser abastecido, em maior proporção, pela produção local, além da introdução de maiores quantidades de espécies de clima tropical (Brainer & Oliveira, 2006).

O estado de Minas Gerais apresenta grande potencial para a produção de plantas ornamentais tropicais, devido a sua aptidão climática para esse setor. A produção está distribuída por todo o estado, destacando-se as regiões Norte e Zona da Mata. As principais espécies cultivadas são: antúrios, helicônias, estrelícias, bastão-do-imperador e gengibres ornamentais, entre outras. Além dessas espécies já cultivadas, as condições edafoclimáticas de Minas Gerais permitem a introdução e o cultivo de plantas já exploradas em outros estados do Brasil, como o cristal-azul e outras folhagens tropicais (Luz et al., 2007).

As principais espécies de flores tropicais cultivadas no Brasil pertencem às famílias Araceae, Heliconiaceae, Musaceae e Zingiberaceae, que vegetam naturalmente ou são exploradas em plantios convencionais na faixa tropical da

América, Ásia e Pacífico Oeste (Assis et al., 2002). São plantas herbáceas, rizomatosas, perenes de reduzido porte ou arborescentes, caracterizadas por suas brácteas de cores e formas variadas, maior durabilidade pós-colheita, de grande beleza, utilizadas para a ornamentação de ambientes.

Nesse contexto, se insere a propagação e cultivo do gênero *Etiligera*, pertencente à família Zingiberaceae, em que se destaca o bastão-do-imperador [*Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith]. Sua propagação ocorre, basicamente, por divisão de touceiras rizomatosas e sementes. Devido ao uso dessa prática de propagação vegetativa tradicional, é preocupante a disseminação de doenças no bastão-do-imperador, causadas pelos agentes *Ralstonia solanacearum* (Vudhivanich, 2002), *Meloidogyne incognita*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani* (Lins & Coelho, 2004).

A utilização da propagação *in vitro*, ou micropropagação, técnica que possibilita a aquisição de material vegetal livre de fitopatógenos, visa reduzir a multiplicação e a disseminação do patógeno. Além disso, por meio da micropropagação, pode-se obter maior quantidade de mudas em curto período de tempo, comparado à propagação vegetativa tradicional.

Baseado no fenômeno da totipotencialidade das células vegetais, isto é, na capacidade de uma única célula se diferenciar e formar uma planta completa, a cultura de tecidos permite a regeneração de uma planta idêntica à planta mãe, contendo todas as informações genéticas num processo caracterizado como clonagem a partir de fragmentos de seus órgãos.

Devido à reduzida literatura a respeito de cultivo *in vitro* de bastão-do-imperador, tornam-se necessárias mais pesquisas sobre essa espécie, relacionadas à sua micropropagação e potencialidades para programas de melhoramento genético no que se refere à resistência contra patógenos, bem como a variação da coloração de suas brácteas.

O desenvolvimento de técnicas de sistemas celulares desprovidos de parede celular (protoplastos, os quais permitem ser cultivados e submetidos à fusão), representa um dos mais significativos avanços em biotecnologia vegetal para efeitos de transformação de plantas (Bajaj, 1977). Essas técnicas são especialmente importantes, uma vez que podem ser aplicadas em estudos de melhoramento de plantas por meio de hibridação somática e obtenção de plantas transgênicas (Jona, 1987).

Objetivou-se, com este trabalho, analisar aspectos da multiplicação *in vitro*, verificar a eficiência de soluções enzimáticas no isolamento de protoplastos e analisar aspectos anatômicos durante a aclimatização de bastão-do-imperador.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição da espécie

A espécie [*Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith], popularmente conhecida como bastão-do-imperador, foi descrita, pela primeira vez, em 1792, por Paul Dietrich Giseke. Na época, houve certa contradição em relação ao gênero ao qual pertencia, recebendo várias denominações, como: *Alpinia*, *Phaeomorina*, *Nicolaia* e *Elettaria*. Em 1980, a pesquisadora Rosemary Margaret Smith, do Botanic Gardens Real Edinburgh, incluiu a espécie no gênero *Etiligera*. Desde então, Axel Dalberg Poulsen, do National Herbarium of the Netherlands, dedicou os seus estudos a essa planta. Este pesquisador relatou a existência de pelo menos 70 espécies, muitas ainda não descritas, que estão distribuídas desde a Índia até as Ilhas do Pacífico (Poulsen, 2006).

Também conhecido por gengibre-tocha ou flor-da-redenção, o bastão-do-imperador é uma planta ornamental ainda pouco difundida no mercado de flores, mas com excelentes perspectivas de comercialização, principalmente como flor para corte, podendo também ser utilizado na composição paisagística.

Consta que a variedade vermelha era usada nas festas religiosas do Peru. Quanto à flor rósea, existem relatos de que ela foi ofertada à Princesa Imperial D. Isabel de Bragança, logo após haver assinado a Lei Áurea, em 13 de maio de 1888, cujo fato deu a origem ao seu nome popular, bastão-do-imperador (Lamas, 2002).

É uma planta herbácea rizomatosa originária da Malásia e pertencente à Ordem *Zingiberales* e à Família *Zingiberaceae*, com mais de 1.300 espécies distribuídas em 49 gêneros (Lamas, 2002). Suas hastes alcançam 2 a 4 m de altura, são eretas com folhas grandes, alongadas e levemente rosadas. Possuem inflorescências grandes de forma piramidal, com escamas verdes e brácteas nas cores vermelha (Figura 1). Só o gênero *Etiligera* possui mais de 70 espécies. É nativa da Malásia e se estende do sul continente indiano até as Ilhas do Pacífico, com maior número de variedades no local de origem (Wu et al., 1981).

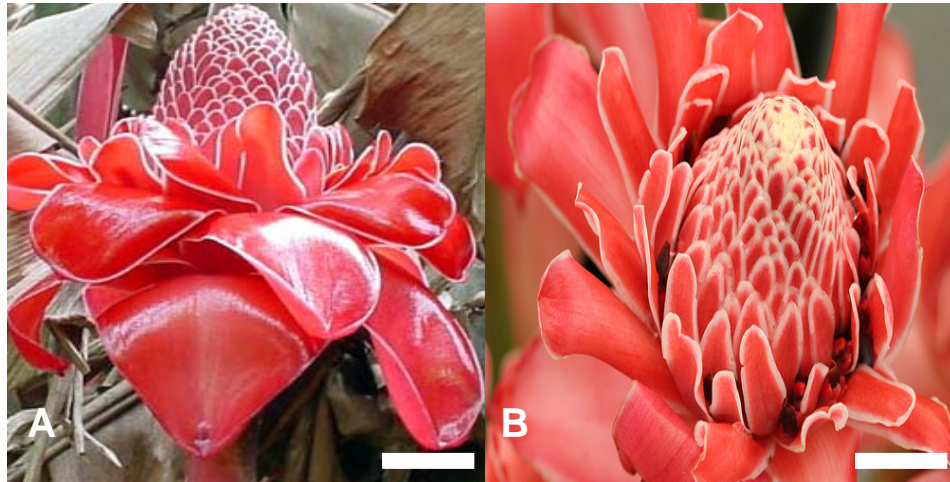


FIGURA 1. (A) Bastão-do-imperador (*Etiligera elatior* Jack R. M. Smith) var. Red Torch. (B) Detalhe da inflorescência formada por brácteas. Fonte: www.viveroanone.com. Barras: 10 cm.

2.2 Importância das Zingiberaceas

Na América do Sul, as Zingiberaceas são usadas em arranjos florais e em diversos tipos de decorações, por possuírem incomparável exotividade e diversidade na coloração de suas brácteas (Fuentes, 2007). A importância principal desse grupo taxonômico está na sua popularidade como plantas ornamentais, pelas suas inflorescências chamativas, sendo essas características muito importantes para distingui-las no campo. Seu crescimento é em forma de “touceiras”, aglomeradas, dessa maneira protegendo os novos brotos, que nascem a partir dos rizomas.

2.3 Variedades

Comercialmente três variedades são exploradas: Red Pink, Red Torch e Porcelana (Lamas, 2002). Mas existem outras, como Venusta, Nicolaia, White Torch, Cornerii “Siam Rose” e Thai Queen.



FIGURA 2. Algumas variedades de bastão-do-imperador. (A) Red Pink; (B) Red Torch; (C) Porcelana; (D) Venusta; (E) Nicolaia; (F) White Torch; (G) Cornerii “Siam Rose” e (H) Thai Queen. Fonte: www.viveroanone.com.

2.4 Doenças em Zingiberaceae

A propagação de Zingiberaceae ocorre, basicamente, por divisão de touceiras rizomatosas e sementes. Devido a essa prática, na propagação vegetativa tradicional existe a preocupação de disseminação de doenças fitopatogênicas na comercialização deste material vegetal e, principalmente, quando ele é destinado à produção comercial em larga escala, além de prejudicar na qualidade do material colhido (Lins & Coelho, 2004).

No Brasil, a questão fitossanitária de plantas ornamentais tem sido objeto de alguns trabalhos (Almeida et al., 1997), no entanto, as flores tropicais estão pouco inseridas nesse contexto. Assis (2002) relata doenças e pragas em helicônias e Coelho & Warumby (2002), doenças e pragas em flores ornamentais tropicais na zona da mata de Pernambuco.

As principais doenças que acometem a família das Zingiberaceae são causadas pelos agentes *Ralstonia solanacearum* e *Rhizoctonia solani*, bacterioses causadoras de podridão de rizoma e de raízes, além de murcha bacteriana, danificando toda a produção vegetativa e floral da planta. Além disso, apresenta um agravante, que é a disseminação rápida, pelo manuseio do material vegetativo, bastando um foco na produção para que seja toda comprometida (Lins & Coelho, 2004).

2.5 Cultura de tecidos em plantas ornamentais

2.5.1 Micropropagação

O mercado de plantas ornamentais está em crescimento, no Brasil e no mundo, o que traz a necessidade da melhoria da qualidade de mudas. Esse incremento de qualidade pode ser obtido por meio da micropropagação, que gera mudas isentas de fitopatógenos e com genótipo e fenótipo homogêneos (Segeren et al., 2003).

As técnicas de cultivo *in vitro* são muito importantes para espécies que têm alto valor comercial para o país, como é o caso das ornamentais consideradas exóticas, como antúrios, bromélias e orquídeas (Donini, 2004).

As plantas ornamentais formam, por excelência, o grupo de plantas em que a aplicação da micropropagação teve uma expressão significativa no mundo científico, com repercussão direta na economia. O incentivo para esse crescimento fundamenta-se no alto valor agregado ao produto final (Bosa et al., 2003), visto que as ornamentais, em especial o bastão-do-imperador, são acometidas por diversas doenças, que levam a prejuízos na produção, por se tratar de um produto cuja aparência é o principal fator.

De acordo com Lins & Coelho (2004), os agravantes para a disseminação de doenças em plantas ornamentais são o clima quente e úmido e as freqüentes precipitações, além da utilização de mudas não certificadas, aumentando, assim, a incidência e a severidade dos problemas fitossanitários na região Nordeste.

Os estudos do cultivo *in vitro* de plantas ornamentais para a propagação foram desenvolvidos, inicialmente, na Inglaterra e França, em orquídeas, crisântemos e em kalanchoe, nos anos 1960. A primeira aplicação comercial da micropropagação foi feita por Morel (1960), ao multiplicar orquídeas mediante cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos, diminutas estruturas que se diferenciavam e davam origem a embriões. A sucessiva divisão desses protocormos acelera a propagação de orquídeas. Essa técnica foi estendida a outros gêneros e encontrou a aplicação prática imediata no começo dos anos 1970. Atualmente, muitos laboratórios comerciais na Europa, na América do Norte e no Sudeste da Ásia produzem milhões de plantas de orquídeas anualmente, a baixo custo (Bornman, 1993).

A principal espécie de plantas ornamentais propagadas em laboratórios Brasileiros é a orquídea, seguida pela *Spathiphyllum*, *Anthurium*, violeta e samambaia. Outras espécies que também são micropropagadas em uma escala menor são: *alstromeria*, amarílis, banana, cyclamen, lírios, carnation, eucaliptos, philodendron, geranium, *gerbera*, gloxinia, *Gypsophila*, *heliconia*, palma,

plumbago, statice, syngonium e *zingiberaceas*. Recentemente, os laboratórios de pesquisa brasileira foram desenvolvendo e adaptando protocolos para muitas espécies ornamentais (Tombolato & Costa, 1998).

Os principais explantes usados na propagação de flores e plantas ornamentais são meristemas, bulbos, folhas e sementes. De acordo com Mantell et al. (1994), há uma escala dos explantes que podem ser tão grandes quanto sementes e órgãos (tais como a cultura do óvulo e dos embriões) ou tão pequenas quanto células e os protoplastos isolados.

A micropropagação apresenta-se como uma alternativa viável de propagação vegetativa. Ela permite obter maior taxa de multiplicação quando comparada aos métodos tradicionais de propagação, com a obtenção de plantas com alta qualidade fitossanitária e estabilidade genética, em menor período de tempo, independente da época do ano (Correia et al., 1999).

Todos os trabalhos com cultura de tecidos envolvendo plantas ornamentais tiveram início a partir de estudos realizados por Murashige (1974) e por Holdgate & Aynsley (1977), provocando grande impacto na produção comercial de sementes das flores e de plantas ornamental.

A cultura de tecidos é um meio de desenvolver células ou tecidos vegetais sob condições controladas. Pode ser definida como a cultura de células vegetais isoladas, de um grupo de células, tecidos ou órgãos em ambiente artificial, sob condições assépticas. Nesse ambiente, células, tecidos e órgãos se multiplicam e continuam a crescer de modo não organizado ou se regeneram numa planta inteira. Costuma-se empregar, associada com a cultura de tecidos, a expressão *in vitro* que significa "crescimento fora do corpo vivo, em ambiente artificial" (Da Silva, 2007).

No entanto, para o uso prático da micropropagação é necessário otimizar as condições de cultura para cada espécie e ou variedade. Dentre os fatores que mais influenciam a maximização do potencial genotípico na multiplicação *in*

vitro, estão os fitorreguladores, em especial as citocininas, como a 6-benzilaminopurina (Leontiev-Orlov et al., 2000).

O controle da morfogênese utilizando tecidos cultivados *in vitro* é feito por meio da indução exógena de estímulos químicos e de substratos diversos. A retirada de fragmentos de tecidos de um organismo íntegro e sua transferência para meio de cultura contendo nutrientes e reguladores de crescimento apropriados trazem como consequência a liberação de suas células do controle, as quais se encontravam nesse organismo e expondo-as a uma condição alterada, permite que o potencial de divisão celular possa expressar-se de novas formas, podendo levar à formação de novas estruturas organizadas, num processo morfogenético que ocorre de novo (Handro & Floh, 1990).

Para Nagao et al. (1994), a micropropagação tem sido utilizada como um meio rápido de propagação vegetativa na indústria da horticultura ornamental e, junto com outras técnicas biotecnológicas, permite a obtenção de grande número de plantas com autenticidade varietal e em qualquer época do ano. O sucesso da micropropagação de plantas não só depende dos fatores inerentes ao tecido vegetal (genéticos e fisiológicos), mas também das condições térmicas e luminosas em que a cultura é mantida, e do meio de cultura apropriado, que permite a indução, a multiplicação e o crescimento das brotações adventícias.

Essa técnica também pode ser usada para se obter variantes somaclonais estáveis com novas formas e cores de flores, inflorescências e folhas. O cultivo *in vitro* também pode ser uma das ferramentas na obtenção de transformantes via engenharia genética (Ferreira et al., 1998).

De acordo com Caldas (1996), várias são as possibilidades promovidas pela cultura de tecidos na obtenção de uma nova planta, seja pelo desenvolvimento de novos órgãos diretamente do explante, o qual recebe o nome de via direta, ou pelo desenvolvimento de tecidos não organizados, formados por

células que se multiplicam formando os calos. Esse processo recebe o nome de via indireta.

2.5.2 Protoplastos em plantas ornamentais

A membrana plasmática das células vegetais está envolvida por uma parede celulósica, e as células adjacentes estão conectadas com uma matriz rica em pectina. A desconexão das células vegetais e a remoção da parede, experimentalmente, tanto por um processo mecânico quanto enzimático, resultam na produção de células vegetais “nuas”, únicas, denominadas protoplastos isolados. Os protoplastos, formando células individuais em cultura, podem ser manipulados com técnicas biotecnológicas (isolamento de mutantes, clonagem celular, fusão celular, transformação genética) e a sua totipotência permite a regeneração de plantas inteiras (Fehér & Dudits, 1994).

De acordo com Matsumoto (2006), protoplasto é um estado transitório de uma célula desprovida de parede celular, comumente pela ação de enzimas pectocelulolíticas. Sem parede celular, os protoplastos adquirem capacidade de incorporar materiais como DNA e de se fundir entre si. Quando a fusão entre protoplastos de diferentes espécies ocorre, híbridos somáticos são obtidos.

A obtenção e a regeneração de plantas, a partir de protoplastos, representa grande avanço para o melhoramento de espécies de interesse agrônômico, destacando-se, como exemplo, a obtenção de híbridos e cíbridos de plantas transgênicas, resultado do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e de cultura de tecidos (Barros & Carneiro, 1998).

Os primeiros experimentos realizados com protoplastos foram realizados por Klercker, em 1892, utilizando o isolamento mecânico. Devido à baixa eficiência dessa metodologia, os protoplastos foram considerados, por muitos anos, apenas como uma curiosidade. Em 1960, enzimas pectocelulolíticas usadas na obtenção de protoplastos aumentaram o rendimento do processo, abrindo

perspectivas do uso desse sistema em pesquisas na biologia vegetal (Cocking, 1960). Em 1970, Nagata & Takebe demonstraram que protoplastos de mesofilo de *Nicotiana tabacum* são capazes de se dividir após a síntese de nova parede celular.

A fusão de protoplastos pode manter a combinação genética de ambos os progenitores envolvidos na hibridação, devido ao fato de não existir segregação meiótica, na hibridação somática, resultando na possível expressão aditiva das características dos híbridos, podendo manter-se, assim, expressos os genes de interesse de ambos os genitores (Grosser & Gmitter, 1990).

Protoplastos de *Iris ensata* and *Iris germânica*, que são espécies de flores ornamentais, foram isolados e submetidos à fusão por meio de corrente elétrica. Após 6 meses da fusão, as plantas regeneradas tiveram o seu DNA analisado pela técnica de RAPD, em que foi confirmado que essas plantas eram mesmo híbridos somáticos entre as duas espécies (Shimizu et al., 1999).

Segundo Morgan (1999), protoplastos de *Cyclamen persicum* cv. Sierra Rose foram isolados a partir de explantes foliares com rendimentos de $1,3 \times 10^6$ protoplastos/gramas MF. Essas células foram cultivadas em uma camada de agarose embebidas em meio KM8p, suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP. O mesmo autor observou que, após 45 dias, divisões celulares começaram a ocorrer e, após 6 meses, os calos cresceram sobre a camada e foram transferidos para meio de cultura MS modificado, para um crescimento adicional desses calos. O melhor meio foi MS suplementado com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ANA e 10 mg L^{-1} TDZ.

Os efeitos de concentrações de glucose, de diferentes açúcares e de combinações de 2,4-D e do cinetina na divisão de células e de formação da colônia, foram examinados nas culturas dos protoplastos isolados enzimaticamente das culturas da suspensão de *Iris hollandica*. O meio N6 foi usado, suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ cinetina + 200 mg L^{-1}

caseína hidrolisada + 250 mg L⁻¹ prolina + 0,3-0,5 M de glucose + 20 g/l agarose, apropriado para a divisão celular e a formação de colônias. Quando as colônias foram transferidas para meio MS sem hormônios, muitas brotações foram induzidas. Quando as brotações foram transferidas para meio MS com 1,0 mg L⁻¹ ANA, a indução da raiz foi observada (Hida et al., 1999).

Para se obter protoplastos, é necessário estabelecer uma combinação enzimática que seja capaz de degradar individualmente a celulose, a hemicelulose e outros polissacarídeos constituintes da parede celular, sem danificar a membrana plasmática. As enzimas mais utilizadas no isolamento de protoplastos são: Cellulase “Onozuka” R-10, que possui atividade celulolítica, descristalização de cadeias e despolimerização da celulose; Macerozyme R-10, que apresenta uma importante atividade endopoligalacturonase, desdobrando assim a pectina e Driselase, que possui atividade pectinolítica e celulolítica. Podem-se ainda citar a celulase Cellulysin, a hemicelulase Rhozyme e a pectinase Pectolyase Y-23 (Carneiro et al., 1998).

Além de uma combinação enzimática eficiente, outros parâmetros devem ser levados em consideração, como: espécie, estado fisiológico da planta, tipo e idade do explante e condições para o isolamento dos protoplastos (Matsumoto, 2006).

A obtenção de variedades melhoradas quanto à tolerância a problemas fitossanitários auxilia no melhoramento da produção de flores, no entanto, existem dificuldades para programas de melhoramento tradicional para a obtenção dessas variedades, devido a aspectos da biologia reprodutiva das diversas famílias utilizadas pelos melhoristas.

Novas perspectivas de mercado na floricultura foram abertas com a clonagem de genes associados à coloração de flores. Cores anteriormente inexistentes para determinada espécie se tornaram possíveis a partir da transformação genética, com genes envolvidos nessas rotas bioquímicas. O

mesmo ocorreu na modificação da arquitetura da planta e das flores, nas fragrâncias e na maior durabilidade das flores. Essa última é associada à manipulação de genes associados a biossíntese do etileno (Brasileiro & Carneiro, 1998).

Segundo Farzad et al. (2005), as cores das flores, das folhas e das frutas são traços importantes nas plantas ornamentais. Os pigmentos, como as antocianinas, que são uma classe dos flavonóides são responsáveis pelas cores vermelhas, violetas e azuis. Naturalmente, em muitas espécies (por exemplo, família das violaceae) a ontogenia da flor submete-se a uma mudança no desenvolvimento para atingir a coloração.

Para Pompelli et al. (2007), um dos mais importantes objetivos ao produzir flores ornamentais é a obtenção de variedades de coloração e pigmentação das flores, que seja o resultado de uma acumulação de metabólitos secundários, tais como compostos flavonóides e carotenóides. As colorações das flores também podem ser obtidas por meio de modificação no gene *CHS* (Chalcona sintase), o qual é responsável pela formação das antocianinas, dos flavonóides e dos carotenóides.

Os pigmentos dos carotenóides pertencem à classe dos isoprenóides, responsáveis pelas cores amarelo, laranja e vermelho, em diversas flores e frutas. Os mecanismos genéticos que controlam esse sinal biossintético já estão elucidados (Cunningham & Gantt, 2002). Entretanto, não se observou ainda nenhuma aplicação nas flores até a presente data, mas, em um futuro próximo, possivelmente haverá muitas flores com cores e formas alteradas com as técnicas biotecnológicas, como, por exemplo, fusão de protoplastos (Pompelli et al., 2007).

2.6 Aclimatização

A aclimatização constitui uma etapa fundamental na produção de mudas obtidas por cultura de tecidos, uma vez que as condições de cultura *in vitro* modificam características bioquímicas, anatômicas e morfológicas das plantas, alterando os processos fisiológicos normais (Lucas et al., 2002). Na fase de aclimatização, as mudas são retiradas do meio de cultivo e transferidas para recipientes contendo substratos. Esses substratos podem influenciar as respostas das mudas por meio de suas características químicas, físicas e biológicas (Gonçalves, 1995). A escolha e o manejo corretos dos mesmos são de suma importância para a obtenção de mudas de qualidade.

Para que a aplicação da micropropagação na produção de mudas torne-se viável comercialmente e possa competir com os métodos tradicionais de propagação (estaquia, enxertia, mergulhia, etc.), é necessário reduzir os custos de produção (Altman, 1999). Esses custos se devem, em grande parte, às perdas causadas pela contaminação *in vitro*, a desordens fisiológicas e morfológicas nas plantas, à baixa percentagem de sobrevivência das plantas no estágio de aclimatização às condições *ex vitro* e à necessidade de mão-de-obra especializada, para a intensiva manipulação dos frascos e das plantas (Kozai & Kubota, 2001).

A natureza heterotrófica ou fotomixotrófica de crescimento das plantas micropropagadas é, diretamente ou indiretamente, responsável pela maioria dos fatores relacionados ao custo de produção dessas plantas (Kozai & Kubota, 2001). Na micropropagação, os explantes são cultivados em frascos sem que ocorra troca gasosa, com alta umidade relativa do ar (aproximadamente 98%), alta concentração de etileno, baixa concentração de CO₂ (que decresce de 3.000 a 9.000 μmol mol⁻¹, no período escuro para menos de 100 μmol mol⁻¹, durante o fotoperíodo), baixa densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, isto é, baixa luminosidade (40 – 50 μmol m⁻² s⁻¹) e com sacarose, como maior fonte

de energia metabólica (Arigita et al., 2002), pelo fato de os explantes apresentarem baixa taxa fotossintética (Kozai & Kubota, 2001).

Explantos cultivados sob regime heterotrófico originam plantas com elevado conteúdo de água, com grande risco de desidratação e morte durante a aclimatização (Kubota & Kozai, 1992) ou com desordens anatômicas e fisiológicas que não possibilitam que o aparato fotossintético opere normalmente (Arigita et al., 2002), resultando na perda de mudas e de mão-de-obra.

As mudanças no ambiente normal de crescimento das plantas têm uma forte influência no desenvolvimento de suas partes aéreas. A superfície e a estrutura interna das folhas e dos caules são alteradas, assemelhando-se a plantas aquáticas. A alta umidade do ar provoca mudanças na estrutura da cutícula, nos depósitos de cera e nas células do mesófilo e dos estômatos das folhas (Hempel, 1994), tornando as plantas suscetíveis a grandes perdas de água por transpiração (Fachinello et al., 1995).

Soluções nutritivas vêm sendo amplamente usadas em estudos de fisiologia vegetal, especialmente aqueles relacionados aos mecanismos que coordenam o crescimento das plantas (Parker & Novell, 1999).

Nesse sentido, na década de 1950, foi proposta, por Hoagland & Arnon (1950), a primeira solução nutritiva para o cultivo de plantas. Desse modo, os primeiros estudos científicos desenvolvidos em solução nutritiva remontam à segunda metade do século XX (Hewitt, 1966). Foram propostas diversas soluções, entre as quais havia, em alguns casos, diferenças marcantes com relação às concentrações dos macronutrientes, enquanto para os micronutrientes as diferenças eram bem menores (Furlani et al., 1999). No Brasil, têm sido utilizadas, em pesquisas com nutrição mineral de plantas, algumas soluções nutritivas, como as propostas por Hoagland & Arnon (1950) e Bolle-Jones (1954).

Portanto, a realização de pesquisas que permitam um melhor entendimento dos principais fatores responsáveis por controlar a excessiva transpiração das plantas micropropagadas, principalmente após a remoção das plantas dos fracos de cultivo, constitui um caminho interessante para o aprimoramento e ou o desenvolvimento de protocolos mais eficientes de transplantio e aclimatização.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, I. M. G.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; IMEMES, S. L. **Problemas fitossanitários em plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Biológico de Campinas, 1997.
- ALTMAN, A. Plant biotechnology in the 21st century: the challenges ahead . **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 2, n. 2, p. 51-55, 1999. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol2/issue2/full/1/>>. Acesso em: 15 out. 2003.
- ARIGITA, L.; GONZÁLEZ, A.; TAMÉS, R. S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.115, p.166-173, 2002.
- ASSIS, S. M. P.; MARINHO R. R. L.; GONDIM JR., M. G. C.; MENEZES, M.; ROSA, R. C. T. Doenças e pragas de heliconias. **Diseases and pests of heliconias**. Recife: UFRPE, 2002.
- BAJAJ, Y. P. S. Protoplasts isolation, culture and somatic hybridization. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Springer- Nova Délhi-Verlag, 1977. p. 467-496.
- BARROS, L. M. G.; CARNEIRO, V. T. C. Eletroporação de protoplastos. In. BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEM, 1998. p. 37-47.
- BOLLE-JONES, E. W. Cooper its effects on the growth of rubber plant (*Hevea brasiliensis*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 10, n. 2, p. 150-178, 1954.

BORMAN, C. H. Micropropagation and somatic embryogenesis. p.246-260. In: HAYWARD, M. D.; BOSEMARK, N. O.; ROMAGOSA, I. (Org.). **Plant breeding: principles and prospects**. Cambridge: Chapman and Hall, 1993.

BOSA, N.; CALVETE, E. O.; KLEIN, V. A.; SUZIN, M. Crescimento de mudas de gipsofila em diferentes substratos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 514-519, jul./set. 2003.

BRAINER, M. S. C. P.; OLIVEIRA, A. A. P. Perfil da floricultura no Nordeste Brasileiro. In: CONGRESSO DA SOBER, 46., 2006, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sober, 2006.

BRASILEIRO, S. L.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa- Cenargem, 1998. 309 p.

CALDAS, L. S. Micropropagação de plantas dos cerrado. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47., 1996, Nova Friburgo. **Anais...** Nova Friburgo, RJ: 1996. p. 22.

CARNEIRO, V. T.C.; CONROI, T.; BARROS, L. M. G.; MATSUMOTO, K. Protoplasto: cultura e aplicações. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Org.). **Cultura de tecidos vegetais e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. v. 1, p. 413-458.

COCKING, E. C. Some effects on roots of tomato seedlings. **Biochemistry and Journal**, n. 76, p. 51-52, 1960.

COELHO, R. S. B.; WARUMBY, J. F. **Doenças e pragas de plantas ornamentais detectadas na Zona da Mata de Pernambuco**: floricultura em Pernambuco. SEBRAE-PE, 2002. p. 67-69. (SEBRAE. Série Agronegócio).

CORREIA, D.; OLIVEIRA, P.M.A.; RIBEIRO, K. A.; SILVEIRA, M. R. S. **Avaliação da multiplicação *in vitro* do abacaxi ornamental (*Ananas lucidus* Miller)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 1999. p. 1-2.

CUNNINGHAM, F. X.; GANTT, E. Molecular control of floral pigmentation: Carotenoids. In: Vainstein A. (Ed.). **Breeding for ornamentals: classical and molecular approaches**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2002. p.273-293.

DESENVOLVIMENTO do agronegócio flores no Brasil. Disponível em: <http://www.pe.sebrae.com.br/Portal/interacto/documentos/FLORICULTURA_PERNAMBUCO.pdf>. Acesso em: 2 abr. 2007.

DONINI, L. P. **Preparo de lâminas foliares de Aráceas ornamentais:** desinfestação e tratamento antioxidante. 2004. 54p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado.** 2.ed. Pelotas: UFPel, 1995. 79 p.

FARZAD, M.; SORIA-HERNANZ D. F.; ALTURA M.; HAMILTON, M. B., WEISS, M. R.; ELMENDORF, H. G. Molecular evolution of the chalcone synthase gene family and identification of the expressed copy in flower petal tissue of *Viola cornuta*. **Plant Science**, v. 168, p. 1127-1134, 2005.

FEHÉR, A.; DUDITS, D. Plant protoplasts for cell fusion and direct DNA uptake: culture and regeneration systems. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture.** Dordrecht: Kluwer, 1994. p. 71-118.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. ; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas,** Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 21-43, 1998.

FUENTES, R. **Taller con pétalos y aroma.** Disponível em: <<http://www.elhabanero.cubaweb.cu>>. Acesso em: 26 maio 2007.

FURLANI, P. R.; SILVEIRA, L. C. P.; BOLONHEZI, D.; FAQUIM, V. **Cultivo hidropônico de plantas.** Campinas: Instituto Agrônomo, p. 52 (Boletim Técnico, 180), 1999.[

GONÇALVES, A. L. Recipientes, embalagens e acondicionamento de mudas de plantas ornamentais. In: MINAMI, K. (Ed.). **Produção de mudas de alta qualidade em horticultura.** São Paulo: T.A. Queiroz, 1995. p. 18.

GROSSER, J. W.; GMITTER, F. G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Review**, Berlin, v. 8, p. 339-374, 1990.

HEMPEL, M. **From micropropagation to microponics:** part II. Practical hydroponics: greenhouses. p.17-20. 1994. Disponível em: <<http://members.ozemail.com.au/~mhempel/publications/mponic2.htm>>. Acesso em: 15 out. 2003.

HIDA, A.; SHIMIZU, K.; NAGATA, R.; YABUYA, T.; ADACHI, T. Plant regeneration from protoplasts of *Iris hollandica* Hort. **Euphytica**, v. 105, p. 99-102, 1999.

HEWITT, E. J. **Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition**. Farham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1966.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950.

HOLGATE, D. P.; AYNSELEY, J. S. The development and establishment of a commercial tissue culture laboratory. **Acta-Horticulturae**, v. 78, p. 31-36, 1977.

HONDRO, W.; FLOH, E. I. S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA/CNPH, 1990. p. 203-212.

JONA, R. **Tissue culture of selected tropical fruit plants; handbook on the application of tissue culture to plant propagation**. Rome: FAO, 1987. p. 124. (FAO Plant Production and Protection Paper, 79).

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da S. **Análise conjuntural das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil**. Disponível em: <http://www.ibraflor.com.br/ibraflor/index.php?id=183;no_cache=1>. Acesso em: 12 maio 2007.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, p. 525-537, 2001.

KUBOTA, C.; KOZAI, T. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum* *in vitro* under forced and natural ventilation. **Hort Science**, Alexandria, v. 27, p. 1312-1314, 1992.

LAMAS, A. M. **Floricultura tropical: técnicas de cultivo**. SEBRAE – PE, 2002. 86 p.

LINS, S. R. O.; COELHO, R. S. B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 332-335, May/June 2004.

LOGES, V.; TEIXEIRA, M. C. F.; CASTRO, A. C. R. de; COSTA, A. S. da. Colheita, pós-colheita e embalagem de flores tropicais em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, jul./set. 2005.

LEONTIEV-ORLOV, O.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L.; ROGALSKI, M.; VENDRUSCOLO, T. Diferentes reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de ameixeira (*Prunus domestica* L.) cultivar Kantimirovskaja, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n.2, p.268-271, 2000.

LUCAS, M. A. K.; SAMPAIO, N. V.; KOHN, E. T.; SOARES, P. F.; SAMPAIO, T. G. Avaliação de diferentes composições de substratos para a aclimação de mudas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch). **Revista Ciência Rural**, v. 8, n. 1, p. 16-23, 2002.

LUZ, P. B. da.; ALMEIDA, E. F. A.; PAIVA, P. D. de O.; RIBEIRO, T. R. Cultivo de flores tropicais. Disponível em: <http://www.artigocientifico.com.br/uploads/artc_1166065542_47.pdf>. Acesso: 23 maio 2007.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas**: uma introdução à engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: SBG, 1994.

MATSOMOTO, K. **Suspensão celular focalizando a bananeira**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 24. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 126).

MORGAN, E. R. Callus production from protoplasts of *Cyclamen persicum*. **Plant- Cell,-Tissue-and-Organ-Culture**, v. 55, p. 63-65, 1999.

MOREL, G. M. Producing virus-free cymbidiums. **American Orchid Society Bulletin**, v. 29, p. 495-497, 1960.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology**, v. 25, p. 135-166, 1974.

NAGAO, E. O.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação “*in vitro*” de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**, Campinas, v. 53, n. 1, p. 25-31, 1994.

PARKER, D. R.; NORVELL, W. A. Advances in solution culture methods for plant mineral nutrition research. In: SPARKS, D. L. (Ed.). **Advances in agronomy**. New York: Academic, 1999. v. 65, p. 151-213.

- POMPELLI, M. F.; DE BRITO, G. G.; OTONI, W. C.; GUERRA, M. P. Biotecnologies for ornamental plants: some insights to the Brazilian productive chain. **International Journal of Horticultural Science**, n. 13, v. 1, p. 51-59, 2007.
- POULSEN, O. D. **Etilingera of Borneo**. Borneo: Natural History, 2006. 263 p.
- SEGEREN, M. I.; CAMPOS, K. J. P.; CORRÊA, M. G. S.; DIAS, J. C. S. Avaliações de fitossanidade de clones de orquídeas no laboratório Proclone. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS, 1., 2003, Lavras. **Resumos...** Lavras: UFLA/ FAEPE, 2003. p. 423.
- SILVA, A. L. C. da. **Cultura de tecidos de plantas**. Disponível em: <<http://br.geocities.com/alcoelho/calogenese.html>>. Acesso em: 2 abr. 2007.
- SHIMIZU, K.; MIYABE, Y.; NAGAIKE, H.; YABUYA, T.; ADACHI, T. Production of somatic hybrid plants between *Iris ensata* Thunb. And *I. germanica* L. **Euphytica**, v. 107, p. 105-113, 1999.
- TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: IAC, 1998. (IAC. Boletim Técnico).
- VUDHIVANICH, S. Effect of soil amendment with urea and calcium oxide on survival of *Ralstonia solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt or rhizome rot of ginger. **The Kasetsart Journal (Natural Sciences)**, v. 36, p. 242-247, 2002.
- WU TE-LIN; CHEN SEN-JEN; TSAI HSI-TAO; TONG SHAO-QUAN; CHEN PEI-SHAN; ZHAO SHI-WANG. Zingiberaceae subfam. Zingiberoideae. In: WU TE-LIN. (Ed.). **Flora Reipublicae Popularis Sinicae**, v. 2, n. 16, p. 22-148, 1981.

CAPÍTULO 2 MULTIPLICAÇÃO DE BASTÃO-DO-IMPERADOR *IN VITRO*

1 RESUMO

SILVA JÚNIOR, Jessé Marques. Multiplicação de bastão-do-imperador *in vitro*. In: _____. [*Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith]: propagação *in vitro*, anatomia e obtenção de protoplastos 2007. Cap. 2, p. 23-49 Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Este trabalho foi realizado com o objetivo desenvolver um protocolo eficiente para a multiplicação *in vitro* de [*Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith]. As brotações provenientes de sementes germinadas *in vitro* foram inoculados em meio MS e suplementados com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) e ANA (0,0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹). Para o teste de fontes alternativas de nitrogênio, substituiu-se o nitrato de amônio por uréia, nas concentrações de 25%, 50%, 75% e 100% de uréia, sem alterar o balanço final de nitrogênio do meio. Para todos os meios de cultura utilizaram-se sacarose a 3% e o agente gelificante (ágar) a 6%. Depois de inoculados, as brotações foram mantidas em sala de crescimento, sob irradiância de fótons de 36 μmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 25±2°C e fotoperíodo de 16 horas. A avaliação foi realizada em três diferentes subcultivos (30, 60 e 90 dias) e, para o teste de substituição do nitrato de amônio por uréia, a avaliação foi realizada durante 45 dias. Para todos os experimentos, foram observados o número de brotações, o tamanho das brotações, o número de raízes e o comprimento dessas raízes. Foi observado que a concentração de BAP (3,0 mg L⁻¹) favoreceu múltiplas brotações. BAP (3,0 mg L⁻¹) e ANA a partir de 0,5 mg L⁻¹, quando adicionados ao meio nutritivo, aumentou significativamente todas as variáveis analisadas. A substituição de nitrato de amônio por uréia até 50% é recomendada, por desenvolver brotações laterais e raízes aos propágulos em condições aceitáveis para a micropropagação em larga escala.

* Comitê de orientação: Ranato Paiva, PhD (Orientador), Dr. Wagner Campos Otoni (Co-orientador); Dr^a. Patricia Duarte de Oliveira Paiva (Co-Orientador).

2 ABSTRACT

IN VITRO MULTIPLICATION OF BASTÃO-DO-IMPERADOR

SILVA JÚNIOR, Jessé Marques. *In vitro* multiplication of Bastão-do-Imperador. In: _____ [*Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith]: **Propagation *in vitro*, anatomy and obtainment of protoplasts**. 2007. Cap. 2, p. 23-49. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

This work aimed to develop an efficient protocol for the multiplication *in vitro* of [*Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith]. The shoots proceeding from *in vitro* germinated seeds had been inoculated in MS medium supplemented with different concentrations of BAP (0,0; 1,0; 2,0 and 3,0 mg L⁻¹) and ANA (0,0; 0,1; 0,5 and 1,0 mg L⁻¹) and for the test of alternative sources of nitrogen, ammonium nitrate was substituted by urea, in the concentrations of (25, 50, 75 and 100% of urea), without modifying the final nitrogen rocking of the medium, for all the culture mediums 3% of sacarose was used and 6% of the gelificant agent (agar). After inoculated, the shoots had been kept in growth room under fofons irradiance of 36µmol m⁻² s⁻¹, temperature of 25 ± 2°C and fotoperiod of 16 hours. The evaluation was carried through in 3 different sub cultivations (30, 60 and 90 days) and for the test of ammonium nitrate substitution by urea the evaluation was carried through during 45 days, for all the experiments had been observed the number of shoots, sizes of the shoots, number of roots and the lengths of these roots. It was observed that the BAP concentration (3,0mg L⁻¹) favored multiple shoots. BAP (3,0mg L⁻¹) and ANA from 0,5mg L⁻¹ when added to the nutritional medium it increased significantly all the variables analyzed. The ammonium nitrate substitution for urea up to 50%, is recommended, for a development of lateral shoots and roots in acceptable conditions on a large scale micropropagation.

* Guidance Committee: Ranato Paiva, PhD (Adviser), Dr. Wagner Campos Otoni (Co-Adviser); Dr^a. Patricia Duarte de Oliveira Paiva (Co-Adviser).

3 INTRODUÇÃO

O bastão-do-imperador (*Etiligera elatior* Jack R. M. Smith) é uma planta herbácea rizomatosa originária da Malásia e pertencente à Ordem *Zingiberales* e à Família *Zingiberaceae*, com mais de 1.300 espécies distribuídas em 49 gêneros (Lamas, 2002). Suas hastes alcançam 2 a 4 m de altura, são eretas com folhas grandes, alongadas e levemente rosadas. Possuem inflorescências grandes de forma piramidal, com escamas verdes e brácteas nas cores vermelha, rosa e porcelana e sua reprodução pode ser via semente ou rizoma, que é um caule radiforme e armazenador das monocotiledôneas, geralmente subterrâneo. Só o gênero *Etiligera* possui mais de 70 espécies. Sua distribuição se estende do sul continente indiano até as ilhas do Pacífico, com maior número de variedades no local de origem (Wu et al., 1981).

A propagação de *Zingiberaceae* ocorre, basicamente, por divisão de touceiras rizomatosas e sementes. Devido a essa prática, na propagação vegetativa tradicional persiste a preocupação com a disseminação de doenças fitopatogênicas na comercialização desse material vegetal e, principalmente, quando eles são destinados à produção comercial em larga escala, além de afetar a qualidade do material colhido (Lins & Coelho, 2004). Segundo Maciel et al. (2004), as plantas ornamentais comercializadas não podem apresentar lesões ou deformações nas folhas e flores, pois são produtos com alto grau de exigência em qualidade pelos consumidores. Os maiores problemas com relação a plantas propagadas por rizomas e bulbos são doenças decorrentes por bacterioses.

Segundo Bosa et al. (2003), as ornamentais são, por excelência, o grupo de plantas em que a aplicação de técnicas de cultura de tecidos, como a micropropagação, teve expressão significativa no mundo científico, com repercussão direta na economia.

De acordo com Chaves et al. (2005), por meio da micropropagação é possível propagar espécies de difícil multiplicação e, ainda, obter mudas saudáveis, livres de vírus, bactérias e fungos, produzindo-se, assim, material de alta qualidade genético-sanitária.

A micropropagação de plantas ornamentais e sua utilização em âmbito comercial já são realidade em diversos países do mundo, destacando-se Holanda, França, Espanha, Japão e o Brasil (Pompelli et al., 2007).

Sabe-se que as fontes de nitrogênio têm grande importância, tanto no crescimento quanto na diferenciação de células e tecidos cultivados *in vitro*. Dados de vários autores, citados por Grattapaglia & Machado (1990), mostram que é a combinação de amônio e nitrato que estimula o crescimento de várias espécies de plantas *in vitro*. A razão entre essas duas fontes de nitrogênio, para os mesmos autores, parece ser o fator determinante causador desse estímulo.

Entretanto, resultados obtidos em roseira (Nash & Davies, 1972) e trigo (Bayley et al., 1972) evidenciam que o nitrato é a melhor fonte de nitrogênio, pois pode, como única fonte de nitrogênio, sustentar boa taxa de crescimento nessas culturas. Efeito favorável de nitrato sobre o crescimento longitudinal das raízes e na formação de raízes laterais em *Oncidium varicosum* também foi observado por Kerbauy (1993). Raab & Terry (1994), quando compararam duas fontes de nitrogênio, constataram que, quando o nitrogênio era suprido na forma de íon amônio, o crescimento de raízes e de brotos de *Beta vulgaris* L. foi bem menor do que quando o nitrogênio foi suprido na forma de nitrato. Além disso, altas concentrações do íon amônio podem causar toxidez nos tecidos de muitas espécies vegetais (Brand, 1993). Outras formas de nitrogênio reduzido, tais como aminoácidos, uréia, poliaminas e ureídeos, têm estimulado o crescimento de células e tecidos vegetais (Kirby et al., 1987).

A intenção de minimizar os custos das mudas provenientes da cultura de tecidos, por conta do elevado custo final da muda, aliado à dificuldade na

aquisição do nitrato de amônio, tem levado à realização de inúmeros trabalhos com o objetivo de buscar uma alternativa para a substituição dessa fonte de nitrogênio. Embora as plantas ornamentais sejam objeto de muita pesquisa, não existem trabalhos realizados com essa espécie, na tentativa de se estudar fontes alternativas de nitrogênio no cultivo *in vitro*.

O objetivo do presente trabalho foi estudar aspectos da multiplicação *in vitro* de *Etiligera elatior* var. Red Torch, visando à adequação de protocolos para estabelecimento, indução de brotações e enraizamento *in vitro*. Essa observação servirá como subsídio para o aperfeiçoamento do sistema de micropropagação dessa ornamental.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de execução dos experimentos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Biologia, no Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais.

4.1.1 Obtenção dos explantes

Frutos maduros de bastão-do-imperador proveniente de plantio comercial na Fazenda Monteiro, no município de Messias, Alagoas, foram mergulhados em solução de hipoclorito de sódio a 0,2% por 30 minutos e, em seguida, lavados com água corrente por 1 minuto.

As sementes foram retiradas dos frutos e despoldadas em uma peneira sob água corrente até a retirada total da mucilagem e levadas para a câmara de fluxo laminar, onde se realizou a desinfestação de acordo com a seguinte seqüência: 1) lavagem em água destilada com 3 gotas de detergente comum por 10 minutos; 2) lavagem por 10 minutos em fungicida tiofanato metílico (Cercobim 700 PM) a 2 g L⁻¹; 3) lavagem por 1 minuto em álcool 70% (v/v); 4) lavagem por 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,6%, juntamente com 2 gotas do detergente Tween 80. Ao final de cada etapa, as sementes receberam três enxágües em água estéril.

As sementes foram postas para germinar em papel de filtro umedecido dentro de placas de Petri (60 X 15 mm) esterilizadas em autoclave. As sementes germinadas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 20 mL do meio de cultura básico de MS enriquecido com 3 mg L⁻¹ de BAP. A cada período de 30 dias, as brotações foram subcultivadas até a obtenção de uma quantidade suficiente de explantes para o início dos experimentos subseqüentes. Foram utilizados como explantes brotações axilares originadas das plântulas germinadas *in vitro*.

4.2 Efeito de diferentes concentrações de BAP sobre a taxa de multiplicação *in vitro*

Explantos foram inoculados em meio de cultura básico MS enriquecido com diferentes concentrações de BAP (Tabela 1) e subcultivados a cada 30 dias.

TABELA 1. Meios de cultura utilizados para a multiplicação de explantes de bastão-do-imperador *in vitro*.

Meios de cultura	Composição
1	MS
2	MS + 1,0 mg L ⁻¹ de BAP
3	MS + 2,0 mg L ⁻¹ de BAP
4	MS + 3,0 mg L ⁻¹ de BAP

A cada 30 dias, durante 90 dias, avaliou-se o número de brotações emitidas por explante, o comprimento dessas brotações, o número e o comprimento das raízes por explante.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 (concentrações de BAP) x 3 (épocas de subcultivo), constituído de 5 repetições, sendo cada repetição representada por 5 frascos contendo um único explante. Os resultados foram submetidos à análise de variâncias e as médias dos tratamentos foram comparadas por regressão e teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa estatístico Sisvar[®] - Sistema de análise de variância.

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento sob irradiância de fótons de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, proveniente de lâmpadas frias Philips TDL, em fotoperíodo de 16 horas e à temperatura de 25±2°C.

4.3 Efeito de níveis de BAP e ANA sobre a indução de brotações múltiplas e alongamento *in vitro*

Os explantes obtidos do melhor tratamento do experimento 3.2 foram inoculados em meio de cultura básico de MS enriquecido com diferentes concentrações de ANA e fixando o nível de BAP, sendo os mesmos subcultivados a cada 30 dias (Tabela 2).

TABELA 2 - Meios de cultura utilizados para indução de brotações múltiplas e alongamento de explantes de bastão-do-imperador *in vitro*.

Meios de cultura	Composição
1	MS + 3,0 mg L ⁻¹ de BAP
2	MS + 3,0 mg L ⁻¹ de BAP + 0,1 mg L ⁻¹ de ANA
3	MS + 3,0 mg L ⁻¹ de BAP + 0,5 mg L ⁻¹ de ANA
4	MS + 3,0 mg L ⁻¹ de BAP + 1,0 mg L ⁻¹ de ANA

A cada 30 dias, durante 90 dias, avaliou-se o número de brotações emitidas por explante e o comprimento dessas brotações, o número e o comprimento das raízes por explante.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 (concentrações de ANA) x 3 (épocas de avaliação: 30, 60 e 90 dias), constituído de 4 tratamentos e 20 repetições, sendo cada repetição representada por um tubo de ensaio contendo uma única brotação cada.

4.4 Efeitos das concentrações de nitrato de amônio e uréia na multiplicação *in vitro* de bastão-do-imperador.

Como fonte de nitrogênio alternativa, os tratamentos consistiram da substituição de 0%, 25%, 50%, 75% e 100% do NH₄NO₃ por uréia e fixando a concentração de BAP em 3 mg L⁻¹ em todos os tratamentos, não tendo o balanço final de nitrogênio do meio de cultura MS sido alterado (Tabela 3).

TABELA 3 Meios de cultura utilizados na multiplicação de bastão-do-imperador *in vitro*

Meios de cultura	Composição
1	MS + 100% de nitrato de amônio + 3,0 mg L ⁻¹ de BAP
2	MS + 75% de nitrato de amônio+ 25% de uréia + 3,0 mg L ⁻¹ de BAP
3	MS + 50% de nitrato de amônio+ 50% de uréia + 3,0 mg L ⁻¹ de BAP
4	MS + 25% de nitrato de amônio + 75% de uréia+ 3,0 mg L ⁻¹ de BAP
5	MS + 100% de uréia

A cada 15 dias, durante 45 dias, avaliaram-se o número de brotações emitidas por explante e o comprimento dessas brotações, o número e o comprimento das raízes por explante.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 20 repetições, sendo cada repetição representada por 1um tubo de ensaio contendo um único explante cada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito de diferentes concentrações de BAP sobre a taxa de multiplicação *in vitro*

Foi observada interação significativa entre a concentração de BAP e a época de avaliação para a variável número de brotos (Figura 1).

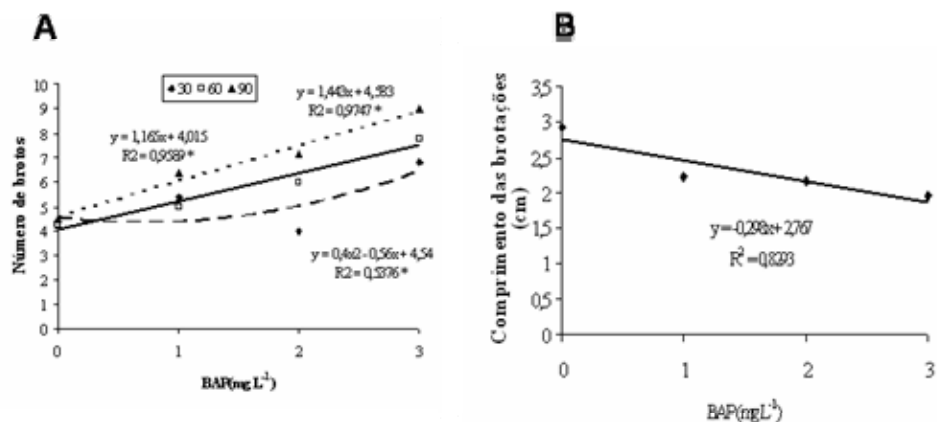


FIGURA 1: (A) Número de brotos de bastão-do-imperador emitidos por explantes iniciais, em função de diferentes concentrações de BAP, aos 30, 60 e 90 dias de cultivo. (B) Comprimento médio das brotações de bastão-do-imperador, em função de diferentes concentrações de BAP, aos 90 dias de cultivo.

Observou-se que, com o aumento da concentração de BAP, houve incremento no número de brotações no três subcultivos (30, 60 e 90 dias). A maior produção de brotações (aproximadamente 9,0) foi obtida em meio de cultura MS contendo 3,0 mg L⁻¹ de BAP, aos 90 dias de incubação.

Pelo gráfico da Figura 1 (A), observa-se que a taxa das brotações apresentou diferenças estatísticas significativas entre os subcultivos (30, 60 e 90 dias) para os tratamentos com BAP, mostrando que a adição desse regulador de crescimento ao meio nas concentrações utilizadas estimulou o surgimento de novas brotações.

Esses resultados demonstram que os tempos de subcultivos são fundamentais para a adaptação dos explantes à nova condição estabelecida, para a detecção e o reconhecimento da fonte exógena de regulador de crescimento e, em uma fase posterior, para a resposta ao estímulo.

Neste trabalho, mesmo não sendo realizada a retirada da gema apical, foi observada a formação de multibrotações, sugerindo que o desenvolvimento das

brotações ocorre em função do balanço hormonal e das características genéticas, uma vez que houve diferença no número de brotações entre as concentrações de BAP testadas, em que 2,0 e 3,0 mg L⁻¹ foram necessários para, provavelmente, quebrar a dominância apical e induzir brotações laterais.

O papel estimulante das citocininas na divisão celular em sistemas de cultura de tecidos é bastante conhecido (Taiz & Zeiger, 2004). BAP tem se destacado, entre as citocininas, pela sua eficiência em induzir a formação de grande número de brotos e elevadas taxa de multiplicação em várias espécies de plantas e, por isso, tem sido mais utilizado em trabalhos de multiplicação *in vitro* do que outras citocininas (Caldas et al., 1998; Grattapaglia & Machado, 1998).

A espécie *Etilingera elatior* var. Red Torch possui um elevado potencial para multiplicação *in vitro*, maior do que outras espécies da mesma família, tais como *Curcuma* spp. e *Zingiber officinale* que, segundo Balachandran et al. (1990), apresentaram média de quatro novos brotos por explante, em meio de cultura MS + 3,0 mg L⁻¹ de BAP.

Borthakur et al. (1999), ao suplementarem o meio de cultura MS com 2,0 mg L⁻¹ de BAP, obtiveram uma média de 3,3 brotos/explante na micropropagação de *Alpinia galanga*. Debiasi et al. (2004), utilizando o meio de cultura MS sem reguladores de crescimento ou contendo 1,0 mg L⁻¹ de BAP no cultivo *in vitro* de *Zingiber officinale*, obtiveram 4,1 e 4,2 novos brotos, respectivamente. Mello et al. (2000), ao cultivarem *in vitro* *Curcuma zedoria*, obtiveram uma multiplicação média de 2,3 brotos/mês, após 320 dias de cultivo, utilizando 2 mg.L⁻¹ de BAP em meio de cultura MS.

Resultados semelhantes foram obtidos por Salarini (1995). Utilizando concentrações crescentes de BAP 0,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹ na indução de brotações em bananeira cv. Prata, esse autor obteve taxas de multiplicação por explante de 0; 4; 6,1 e 7,6 brotos, respectivamente.

Macêdo et al. (2003), utilizando concentrações de BAP ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) na multiplicação de abacaxi (*Ananas comosus*), obtiveram taxa de multiplicação de 6 brotos por explante, o que não obtiveram em concentrações inferiores ou na ausência desse regulador (0,0; 0,1 e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$), apresentando 0, 2 e 3 brotos por explante, respectivamente.

Contrário aos resultados obtidos neste experimento, Cantagallo et al. (2005), estudando o efeito de diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; $1,0$ e $1,5 \text{ mg L}^{-1}$) na indução de brotações de gemas axilares em citrumelo “Swingle”, observaram que, à medida que se aumentou a concentração de BAP, houve tendência de redução das brotações.

Para a variável comprimento médio dos brotos, não houve interação significativa, mas, quando as fontes de variações foram avaliadas isoladamente, ocorreu interação. Observou-se que, à medida que se aumentou a concentração de BAP, houve redução no comprimento das brotações (Figura 1 B).

Debiasi et al. (2004) também obtiveram maior comprimento de brotações (3,2 cm), ao cultivarem *Zingiber officinale* em meio de cultura MS desprovido de reguladores de crescimento. Esse fato tem sido relacionado diretamente à conhecida capacidade das citocininas em promoverem muitas brotações na parte aérea, em detrimento do alongamento. O mesmo autor ainda relata que o comprimento médio das brotações micropropagadas é inversamente proporcional à taxa de multiplicação. Essa informação é confirmada neste trabalho, já que as maiores médias em comprimento (2,93 cm) dos novos brotos emitidos foram verificadas em MS desprovido de reguladores de crescimento que, por sua vez, apresentou as menores taxas de multiplicação (9,0).

Debiasi et al. (2004) também observaram que a taxa de brotação não apresentou diferenças estatísticas entre as épocas de cultivo *in vitro* (15 e 30 dias) entre os tratamentos.

Lemos et al. (2001), cultivando clones de banana cv. Terra, também observaram que o comprimento médio das brotações, cultivadas no meio de cultura sem reguladores de crescimento, foi maior do que o daqueles explantes cultivados em meio com BAP.

Foi observada interação significativa para número e comprimento de raízes. Explantes em meio de cultura MS desprovido de reguladores de crescimento mostraram-se capazes de produzir o maior número (4,75) e comprimento médio das raízes (3,14cm) em relação aos meios com diferentes concentrações de BAP (Figura 2). Com o aumento da concentração de BAP e ao longo dos subcultivos, as variáveis supracitadas decresceram.

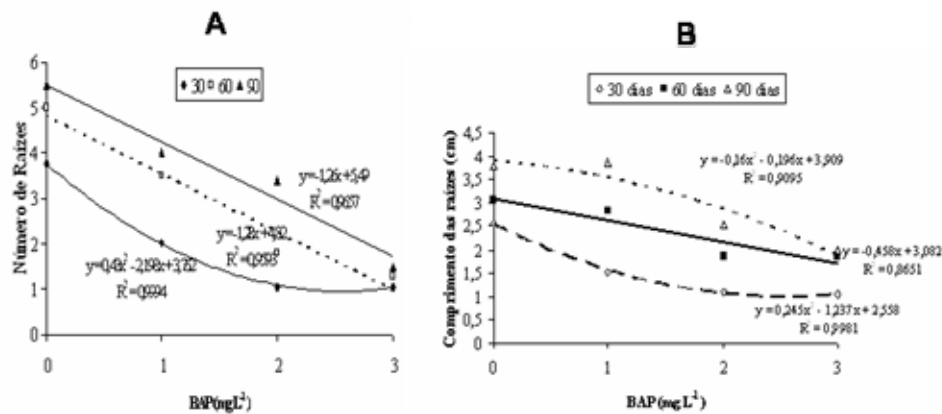


FIGURA 2. (A) Efeito de diferentes concentrações de BAP no número médio das raízes de bastão-do-imperador, aos 30, 60 e 90 dias de cultivo. (B) Efeito de diferentes concentrações de BAP no comprimento das raízes (cm) de bastão-do-imperador, aos 30, 60 e 90 dias de cultivo.

Os resultados obtidos indicam que a presença e a permanência prolongada das brotações em meio nutritivo contendo citocinina BAP alteraram notavelmente o balanço hormonal favorável para a formação de raízes, indicando a necessidade da adição de uma auxina para restabelecer a sinalização química para a rizogênese.

Resultado semelhante quanto ao número de raízes foi obtido por Borthakur et al. (1999), para *Alpinia galanga*, 7,1 raízes por explante em meio desprovido de regulador de crescimento; ao adicionar BAP ao sistema, na concentração de 2 mg L⁻¹, houve redução da formação de raízes (3,1 raízes por explante).

Assim como constatado por Cantagallo et al. (2005), os resultados aqui obtidos confirmam que a citocinina BAP possui efeito indutor de brotações e inibidor do alongamento de brotos e de raízes de bastão-do-imperador.

5.2 Efeito de níveis de BAP e ANA sobre a indução de brotações múltiplas e alongamento *in vitro*

Para o número de brotos, não foi observada interação significativa entre concentrações de ANA e épocas de subcultivo. Observou-se que, com o aumento da concentração de ANA, houve incremento no número de brotações, atingindo 9,82 brotações por explante (Figura 3).

Com a adição de 3,0 mg L⁻¹ de BAP, que apresentou os melhores resultados no experimento anterior, combinada com 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de ANA, obteve-se maior produção de brotos (8,16 e 9,82 brotos, respectivamente) de *Etiligera elatior* var. Red Torch (Figura 3A).

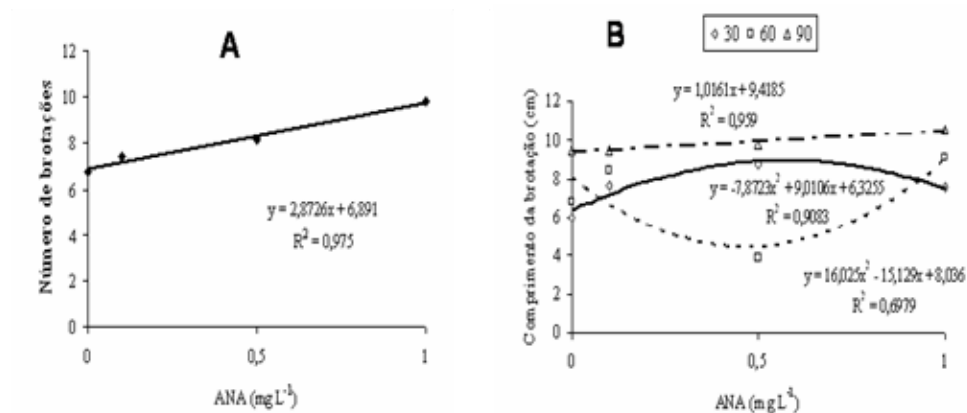


FIGURA 3. (A) Número de brotos de bastão-do-imperador formados por explantes iniciais subcultivados em diferentes concentrações de ANA, aos 90 dias de cultivo. (B) Comprimento médio de brotos de bastão-do-imperador emitidos por explantes iniciais aos 30, 60 e 90 dias de cultivo *in vitro*, em função de diferentes concentrações de ANA.

Segundo Carvalho et al. (2003), a concentração ideal para estimular o aparecimento de novas brotações em amendoim (*Arachis hipogaea*) é de 10,0 mg L⁻¹ de BAP e 1,0 mg L⁻¹ ANA (3,3 brotos/explante). Estes pesquisadores ainda observaram que, na ausência de ANA, independente das concentrações de BAP (5; 10; 15 e 20 mg L⁻¹), o número de brotações reduziu 30% (1,51; 2,35; 2,73; 2,45 e 2,65 brotos respectivamente).

Ramos & Carneiro (2007), trabalhando com *Cattleya x mesquira*, com o objetivo de desenvolver multibrotações pelo método do estiolamento de segmentos caulinares, não observaram interação significativa entre os níveis de BAP e ANA. Foram obtidos 3,71 brotos/explantes com 2,0 mg L⁻¹ de ANA e, com a adição de BAP, houve menor formação de novas brotações. Estes pesquisadores concluíram que o efeito desses reguladores, quando utilizados individualmente, é mais eficiente na formação de novas brotações e produção de nós em segmentos caulinares estiolados.

Com relação ao comprimento das brotações (Figura 3 B), observou-se interação significativa entre as fontes de variação (ANA x subcultivo). A tendência geral dos tratamentos foi de aumento do comprimento com o aumento da concentração, durante o segundo (60 dias) e o terceiro (90 dias) subcultivos.

Na Figura 4, pode-se observar a aspecto geral das brotações laterais obtidas a partir de explantes iniciais inoculados em meio de cultura MS suplementado com $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA.

Resultados semelhantes foram encontrados por Ramos & Carneiro (2007), testando diferentes concentrações de BAP e ANA com o objetivo de aumentar o tamanho das brotações em *Cattleya x mesquitae*. Ao utilizarem uma concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, verificaram que as novas brotações eram de menor tamanho, ao passo que o uso dos dois fitorreguladores ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ANA) proporcionou a formação de brotações de tamanho médio e mais robustas, indicando maiores possibilidades de regeneração e formação de novos explantes.

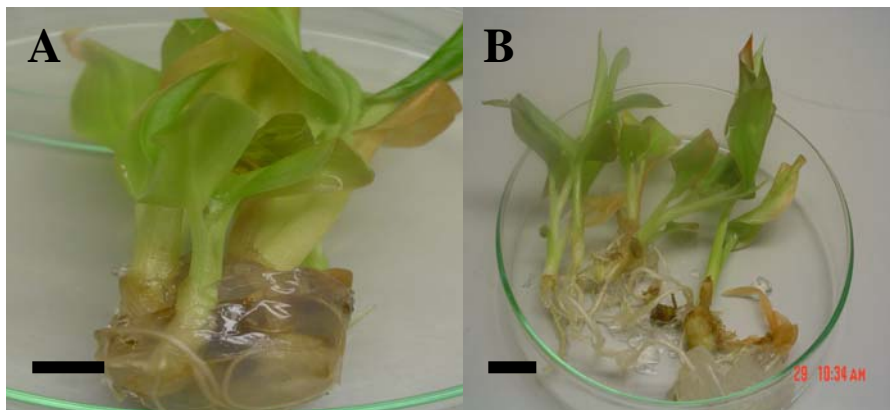


FIGURA 4. (A) Brotações laterais formadas ao final de cada subcultivo; (B) detalhe da individualização das brotações obtidas em explantes de bastão-do-imperador, em meio de cultura MS suplementado com 3 mg L^{-1} de BAP e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA. UFLA. Lavras, MG, 2007. Barras: 50 mm.

Para as variáveis número e comprimento de raízes, observou-se que a espécie é de fácil enraizamento, que é obtido na ausência de qualquer fator indutor desse processo.

No tratamento desprovido de ANA, obteve-se a formação de 7,95 raízes e comprimento de 8,93 cm (Figura 5).

A utilização de ANA, a 0,1 e 0,5 mg L⁻¹, proporcionou 9,06 raízes com 9,73 cm, em média; já na maior concentração (1,0 mg L⁻¹), formaram-se 10,10 raízes com um comprimento médio de 11,23 cm (Figura 5 e 6). Observou-se comportamento retilíneo crescente na regressão, evidenciando que a espécie responde bem a concentrações crescentes desse regulador.

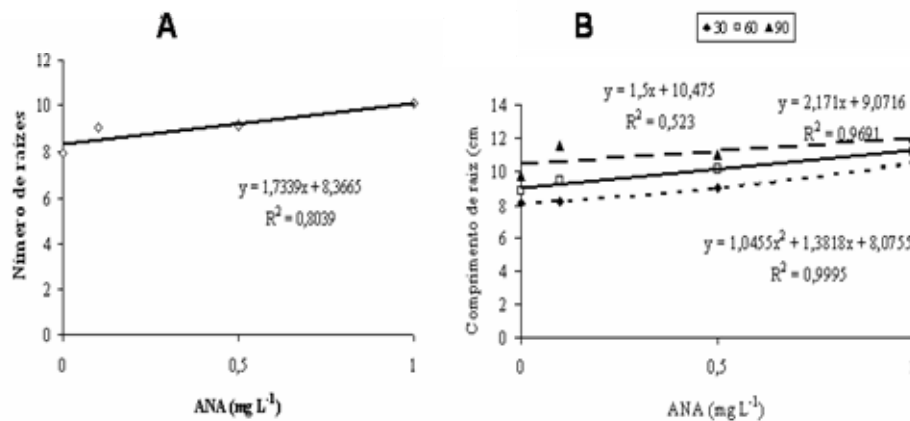


FIGURA 5. (A) Efeito de diferentes concentrações de ANA no número médio das raízes de bastão-do-imperador, aos 90 dias de cultivo.(B) Comprimento médio das raízes (cm) de bastão-do-imperador em função de diferentes concentrações de ANA, aos 30, 60 e 90 dias de cultivo.

Melo et al. (2001), utilizando concentrações crescentes de ANA, verificaram que, na maior concentração (1,0 mg L⁻¹), houve maior formação de raízes (5,60).

Contrário a este experimento, no qual as raízes apresentaram aspecto fino e comprido na presença de ANA, Salarini (1995), testando diferentes concentrações do mesmo regulador (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) no enraizamento de brotações de *Musa* sp., observou que, na maior concentração, ele induziu o maior número de raízes. Porém, elas eram curtas e grossas, enquanto que, na ausência ou em baixos níveis de ANA, formaram-se poucas raízes, finas e compridas.

Para comprimento de raiz, interação significativa foi observada para as fontes de variação ANA x subcultivo. Pelo gráfico da Figura 5 B, pôde-se observar que quanto maior a concentração de ANA no meio de cultura, maior era o comprimento das mesmas, evidenciando também um efeito linear crescente. O mesmo foi observado para o número de raízes.

Ering et al. (2004), estudando o enraizamento de explantes de *Pyrus communis* L., observaram um comportamento linear ascendente, semelhante ao encontrado neste trabalho para número de raízes e comprimento. Estes autores concluíram que, nas concentrações testadas (0,0; 3,0 e 5,0 mg L⁻¹ de ANA), houve maior formação de raízes e maior comprimento (1,67 raízes e 1,78 cm respectivamente), na concentração de 5,0 mg L⁻¹.

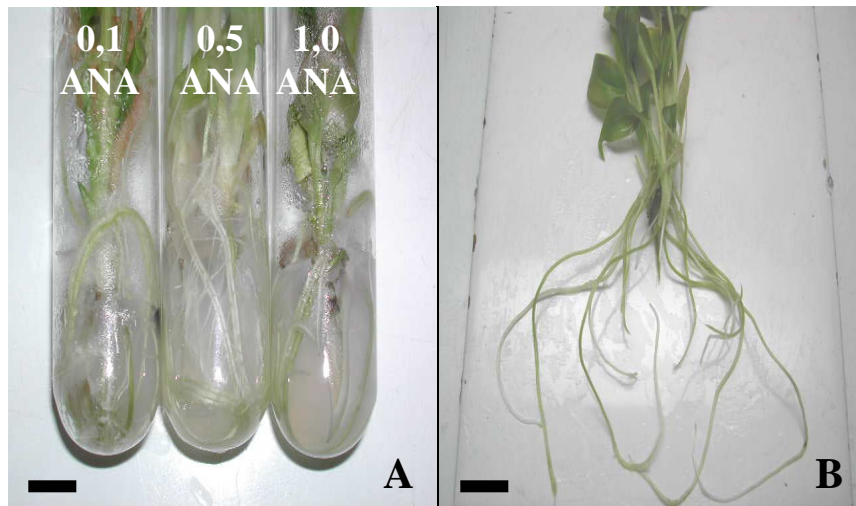


FIGURA 6. (A) Aspecto visual das raízes de bastão-do-imperador obtidas na presença de diferentes concentrações de ANA. (B) Raízes formadas na presença de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA. UFLA, Lavras, MG, 2007. Barras 50 mm.

5.3 Efeitos das concentrações de nitrato de amônio e uréia na multiplicação *in vitro*

Para a variável número de brotações, o melhor tratamento observado foi o uso de 100% de nitrato de amônio, o qual proporcionou a formação de, em média, 6,73 brotações por explante. Com a adição de uréia observou-se redução na taxa de brotação (Tabela 3).

TABELA 4. Valores médios das variáveis analisadas, obtidos nos tratamentos de substituição de nitrato de amônio por uréia no meio de cultura em bastão-do-imperador, aos 45 dias de cultivo.

Tratamento	Número de brotações	Comprimento brotação (cm)	Número de raízes	Comprimento raízes (cm)
100% nitrato de amônio	6,73 a	7,43 a	7,95 a	8,93 a
75% de nitrato de amônio + 25% de uréia	6,52 a	7,21 a	6,6 b	7,28 b
50% de nitrato de amônio + 50% de uréia	5,65 b	5,82 b	6,0 b	6,85 c
25% de nitrato de amônio + 75% de uréia	5,2 b	5,68 b	4,0 c	4,28 d
100% de uréia	5,0 b	5,23 b	3,9 c	4,02 d
CV%	20,05	15,36	13,25	18,33

A utilização de 50% de nitrato + 50% de uréia proporcionou uma formação de 5,65 brotos por explante, evidenciando uma perda no número de brotos de apenas 16% em relação ao uso de 100% de nitrato de amônio. Em termos de redução dos custos, esses resultados são bastante promissores, pois a redução do número de brotos está dentro dos limites aceitáveis para que se possa fazer a micropropagação desta espécie, além de um menor custo no preço final das mudas para os produtores.

Fráguas et al. (2003), trabalhando com substituição de nitrato de amônio por uréia em *Gloxinia speciosa*, verificaram que, em concentrações superiores a 20% de uréia, houve morte das plântulas, evidenciando efeito fitotóxico, o qual não foi observado no presente trabalho.

O melhor resultado para a variável comprimento médio de brotações foi obtido na presença de 100% de nitrato de amônio, isto é, na concentração original de NH_4NO_3 do meio MS (Tabela 3). Quando se adicionou uréia ao meio de cultivo, observou-se uma queda no tamanho das brotações. Resultados semelhantes foram relatados por Marques et al. (1998). Trabalhando com fontes de nitrogênio no desenvolvimento de crisântemo *in vitro*, estes autores verificaram menor comprimento de brotações quando foram adicionados 100 mg L^{-1} de uréia no meio MS.

Possivelmente, a adição de uréia inibiu parcialmente o efeito da citocinina (BAP), com decréscimos de formação de brotos de 16% em relação ao uso de 100% de nitrato de amônio (Tabela 3). Esse resultado difere dos encontrados por Roy et al. (1996), que obtiveram aumento de 10 para 60 brotações por subcultura de *Syzygium cumini* Skeels, utilizando 100 mg L^{-1} de uréia no meio de cultura. Abha et al. (1992) também obtiveram grande número de brotações diretas de *Dendrobium wardianum* Warner, utilizando 2,5 ou 5 mg L^{-1} de uréia no meio de cultura.

O melhor tratamento para a formação de raízes foi o uso de 100% de nitrato de amônio. Mas, Marques et al. (1998) concluíram que concentrações até 200 mg L^{-1} de uréia adicionada ao meio de cultura favoreceram uma maior formação de raízes que o meio MS original, contrastando com os resultados deste trabalho.

Para as variáveis número e comprimento das raízes, o uso de 50% de nitrato + 50% de uréia apresentou 5,4 raízes e 6,85 cm. Esses números representam 24%, 53% e 23,3% de diminuição na rizogênese, respectivamente.

Os piores resultados, para todas as variáveis analisadas, foram com 100% de uréia, evidenciando a intolerância da espécie a níveis elevados de uréia no meio (Tabela 4).

Folhas com coloração verde-claro, secas e com menor desenvolvimento, provavelmente devido a uma diminuição no teor de clorofila e fitotoxidez, foram observadas na presença de 100% de uréia (Figuras 7A e B).

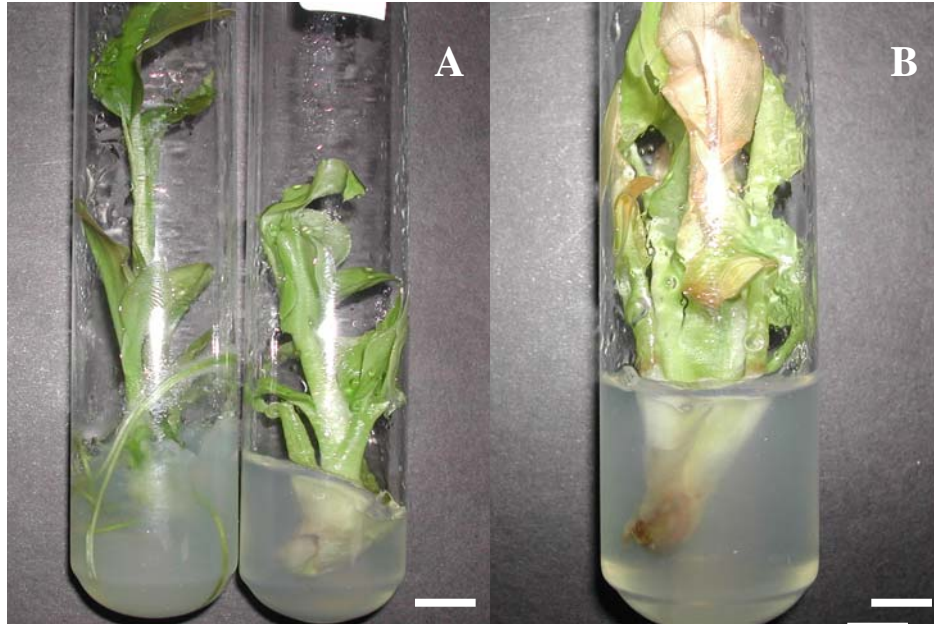


FIGURA 7. (A) Aspecto das brotações de bastão-do-imperador na presença de 100% de nitrato de amônio (esquerda) e 100% de uréia (direita), aos 45 dias de cultivo; (B) Brotação de bastão-do-imperador apresentando senescência foliar e desenvolvimento anormal na presença de 100% de uréia, aos 45 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2007. Barras 1 cm.

6 CONCLUSÕES

A taxa de multiplicação de 9,0 brotos nos três subcultivos, obtida nesse trabalho, em meio de cultura MS enriquecido com 3 mg L⁻¹ de BAP, foi suficientemente elevada para viabilizar a produção em larga escala de mudas micropropagadas de *Etilingera elatior* var. Red Torch.

A mudança de ambiente, a redução na quantidade de meio de cultura e a adição do regulador de crescimento ANA (1,0 mg L⁻¹) favoreceram um aumento significativo no número de brotações: 9,32 brotos; comprimento das brotações: 9,02 cm; números de raízes: 10,1 raízes/brotação e comprimento das raízes: 11,23 cm, nos três subcultivos

O uso de 50% de nitrato de amônio + 50% de uréia é o recomendado para a multiplicação de bastão-do-imeperador.

Com a adição de 100% de uréia houve um declínio no número de brotações, no comprimento médio da maior brotação e no número de raízes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABHA, S.; PRAMOD, T.; SHARMA, A.; TANDON, P. *In vitro* culture of *Dendrobium wardianum* Warner: morphogenetic effects of some nitrogenous. **Indian Journal of Plant Physiology**, India, v. 35, n. 1, p. 80-85, 1992.
- BALACHANDRAN, S. M.; BHAT, S. R.; CHANDEL, K. P. S. *In vitro* clonal multiplication of turmeric (*Curcuma* spp.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Plant Cell Reports**, v. 8, n. 9, p. 521-524, 1990.
- BAYLEY, J. M.; KING, J.; GAMBORG, O. L. The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. **Planta**, n. 105, p. 15-24, 1972.
- BORTHAKUR, M.; HAZARIKA, J.; SINGH, R. S. A protocol for micropropagation of *Alpinia galanga*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 55, p. 231-233, 1999.
- BOSA, N.; CALVET, E. O.; NIENOW, A. A.; SUZIN, M. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 207-210, abr./jun. 2003.
- BRAND, M. H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, n. 35, p. 203-209, 1993.
- CHAVES, A. da C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, nov./dez. 2005.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. p. 261-296.
- CANTAGALLO, F. de S.; AZEVEDO, F. A. de; SCHINOR, E. H.; M. FILHO, F. de A. A.; MENDES, B. M. J. Micropropagação de citrumelo 'swingle' pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 136-138, abr. 2005.
- CARVALHO, J. M. F. C.; FURTADO, C. M.; SILVA, H.; CASTRO, J. P. de. Metodologia para o Superbrotamento de Amendoim (*Arachis hipogaea*) através do Cultivo *in vitro*. Campina Grande: PB, MAPA, 2003. (Comunicado Técnico, 196)

- DEBIASI, C.; FELTRIN, F.; MICHELUZZI, F. de C. Micropropagação de gengibre (*Zingiber officinale*). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 1, p. 61-65, 2004.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; BRAGA, E. J. B. Enraizamento *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick Cienc. Nota fitotécnica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, jan./fev. 2004.
- FRÁGUAS, C. B.; CHAGAS, E. A.; FERREIRA, M. M.; CARVALHO, J. G.; PASQUAL, M. Micropropagação de gloxínia em diferentes concentrações de nitrato de amônio e uréia. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 811-815, jul./ago. 2003.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos de plantas**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1990. p. 99-169.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa - SPI / Embrapa - CNPH, 1998. p. 183-260.
- LAMAS, A. M. **Floricultura tropical: técnicas de cultivo**. SEBRAE – PE, 2002. p. 88.
- KERBAUY, G. B. Indução *in vitro* de protocormóides em raízes de *Oncidium varicosum*. Efeitos de fontes nitrogenadas, auxinas e citocininas. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 16, p. 1-8, 1993.
- KIRBY, E. G.; LEUSTEK, T.; LEE, M. S. Nitrogen Nutrition. In: **Cell and Tissue Culture in Forestry**. In: BONGA, J. M; DURZAN, D. J. (Ed.). Dordrecht: M. Nijhoff, 1987. v. 1, p.67-88.
- LEMONS, E. P. L.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de clones de Banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 482-487, 2001.
- LINS, S. R. O.; COELHO, R. S. B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 332-335, May/June 2004.
- MACÊDO, C. E. D. de.; SILVA, M. G. da; NÓBREGA, F. S. da; MARTINS, C. P.; BARROSO, P. A. V.; ALLOUFA, M. A. I. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 501-504, 2003.

- MACIEL, J. L. N.; DUARTE, V.; SILVEIRA, J. R. P. Densidade populacional de *Ralstonia solanacearum* em cultivares de batata a campo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 19-24, Jan./Fev. 2004.
- MARQUES, D. A.; SHEPHERD, S. L. K.; CROCOMO, O. J. Influência de fontes de nitrogênio sobre o desenvolvimento das gemas axilares de explantes caulinares de *Chrysanthemum morifolium* Ramat cultivado *in vitro*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21 n. 2, ago. 1998.
- MELLO, M. O.; AMARAL, A. F. C.; MELLO, M. Quantifying the micropropagation of *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 4, p. 703-707, 2000.
- MELO, de B.; PINTO, J. E. B. P.; LUIZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Efeitos de ANA a AIB *in vitro* no enraizamento e crescimento da parte aérea de plântula de goiabeira [*Syagros olercea* (Mart). Becc.]. **Bioscience Journal**, v. 17, n. 1, p. 49-59, June 2001.
- NASH, D. T.; DAVIES, M. E. Some aspects of growth and metabolism of Pauls Scarlet Rose cell suspensions. **Journal Experimental Botany**, v. 23, p. 75-91, 1972
- POMPELLI, M. F.; DE BRITO, G. G.; OTONI, W. C.; GUERRA, M. P. Biotecnologies for ornamental plants: some insights to the Brazilian productive chain. **International Journal of Horticultural Science**, n. 13, v. 1, p. 51-59, 2007.
- RAAB, T. K.; TERRY, N. Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. **Plant Physiology**, n. 105, p. 1159-1166, 1994
- RAMOS, T. V.; CARNEIRO, I. F. Multiplicação *in vitro* de *cattleya xmesquiae* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 1, n. 37, p. 10-15, mar. 2007
- ROY, P. K.; RAHMAN, M. M.; ROY, S. K. Clonal propagation of *Syzygium cumini* L. through *in vitro* culture. **Bangladesh Journal of Botany**, Bangladesh, v. 25, n. 2, p. 159-164, 1996.
- SALARINI, V. J. **Micropropagação, indução de calos e isolamento de protoplastos de bananeira (*Musa spp.*)**. 1995. 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Tradução de Eliane Romanato Santarém et al. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 718.

WU T.; CHEN, S.; TSAI, H.; TONG, S.; CHEN, P.; ZHAO, S. *Zingiberaceae*
subfam. Zingiberoideae. **Flora Reipublicae Popularis Sinicae**, v. 2, n. 16, p.
22-148, 1981.

CAPÍTULO 3

ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS DE BASTÃO-DO-IMPERADOR

SILVA JÚNIOR, Jessé Marques. Eficiência de soluções nutritivas, tempo de incubação e teste de viabilidade na obtenção de protoplastos de bastão-do-imperador. In: _____ [*Etligera elatior* (Jack) R. M. Smith]: **propagação *in vitro*, anatomia e obtenção de protoplastos** 2007. Cap. 3, p. 50-72 Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

1 RESUMO

Com o objetivo de realizar hibridações, que auxiliam em programas de melhoramento genético de flores ornamentais, protoplastos foram isolados a partir de diferentes tecidos (folhas *in vitro*, pseudocaulis *in vitro* e folhas em sistema hidropônico) de [*Etligera elatior* (Jak) R. M. Smith]. Foram testados seis diferentes combinações enzimáticas, tempos de incubação, concentração de manitol, o diâmetro e a viabilidade dos protoplastos isolados. A melhor fonte de explante utilizado no isolamento de protoplastos foi folha *in vitro*, com rendimento de 22×10^5 protoplastos/ g MF. O melhor tempo de incubação foi 15 horas, pois períodos superiores a este causavam diminuição no rendimento, bem como na viabilidade dos protoplastos. A folha *in vitro* apresentou viabilidade de 96% e também protoplastos de maior diâmetro 36,7 μm . Com relação ao tipo de sistema rotatório (40 rpm) ou estacionário, maiores rendimentos foram alcançados em sistema rotatório e no escuro. A melhor combinação enzimática utilizada neste experimento foi a E (3% Cellulase “onozuka” R-10 + 2% Meicelase + 1% Driselase + 1% Dextran). Das concentrações de manitol testadas (0,5 M; 0,6 M e 0,7 M), a melhor foi 0,6 M (11 g/100mL de manitol).

* Comitê de orientação: Ranato Paiva, PhD (Orientador), Dr. Wagner Campos Otoni (Co-orientador); Dr^a. Patricia Duarte e Oliveira Paiva (Co-Orientador).

2 ABSTRACT

ISOLATION OF PROTOPLASTS OF BASTÃO-DO-IMPERADOR

SILVA JÚNIOR, Jessé Marques. Eficiência de soluções nutritivas, tempo de incubação e teste de viabilidade na obtenção de protoplastos de bastão-do-imperador. In: [*Etligera elatior* (Jack) R. M. Smith]: **Propagation in vitro, anatomy and obtainment of protoplasts**. 2007. Cap. 3, p. 50-72 Dissertation (Master in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

With the hybridization aim, that had assisted programs of genetic improvement of ornamental flowers, protoplasts had been isolated from different tissues (*in vitro* leaves, *in vitro* pseudostem and leaves in hydroponic system) of [*Etligera elatior* (Jack) R. M. Smith], testing six different enzymatic combinations, time of incubation, concentrations of manitol, the diameter and the viability of the isolated protoplasts. The best source of explants used in the isolation of protoplasts was *in vitro* leaf with income of 22×10^5 protoplasts/g MF. The optimum time of incubation was 15 hours, therefore superior periods to this, caused reduction in the income, as well as in the viability of the protoplasts. The *in vitro* leaf, presented a viability of 96% and also presented protoplasts bigger than $36,7\mu\text{m}$ of diameter. Verifying the type of rotatory system (40 rpm) or stationary, bigger incomes had been reached in rotatory system and the dark one. The best enzymatic combination used in this experiment was the E (3% Cellulase “onozuca” R-10 + 2% Meicelase + 1% Driselase + 1% Dextran). Of the concentrations of manitol tested (0,5 M; 0,6 M and 0,7 M), the best was 0,6 M (11 g/100mL of manitol).

* Guidance Committee: Ranato Paiva, PhD (Adviser), Dr. Wagner Campos Otoni (Co-Adviser); Dr^a. Patricia Duarte de Oliveira Paiva (Co-Adviser).

3 INTRODUÇÃO

O bastão-do-imperador é uma planta ornamental ainda pouco difundida no mercado de flores, mas com imensas perspectivas de aplicações, quer como flor de corte ou em composição paisagística de jardins e bosques (Lamas, 2002).

Plantas ornamentais, em especial o bastão-do-imperador, são acometidas por diversas doenças, que causam prejuízos à produção. Por isso, pesquisas relacionadas à micropropagação e à potencialidade para programas de melhoramento, com relação à sua resistência a patógenos, são de grande interesse.

Diversos métodos estão disponíveis para transformar geneticamente uma planta e a escolha depende da espécie. Normalmente, os métodos baseados na bactéria *Agrobacterium tumefaciens* são os mais eficientes para transformar dicotiledôneas (Gelvin, 1998).

Em condições bem estabelecidas de cultura, os protoplastos são capazes de manter a totipotencialidade celular, reconstituindo suas paredes, dividindo-se, formando calos e regenerando plantas por embriogênese ou organogênese (Barros & Carneiro, 1998).

De acordo com Matsumoto (2006), protoplasto é um estado transitório de uma célula desprovida de parede celular, comumente obtido pela ação de enzimas pectocelulolíticas. Sem parede celular, os protoplastos adquirem capacidade de incorporar materiais como DNA e de fundir entre si. Quando a fusão ocorre entre protoplastos de espécies diferentes, híbridos somáticos são obtidos.

As enzimas mais utilizadas no isolamento de protoplastos são: Cellulase “Onozuka” R-10 (Yakult Honsha), que possui atividade celulolítica, descristalização de cadeias e despolimerização da celulose; Macerozyme R-10 (Yakult Honsha), que tem uma importante atividade endo-poligalacturonase,

desdobrando assim a pectina e Driselase, que possui atividade pectinolítica e celulolítica. Podem-se, ainda, citar a celulase Cellulysin, a hemicelulase Rhozyme e a pectinase Pectoyase Y-23 (Carneiro et al., 1998).

A solução comumente utilizada para pré-plasmólise dos tecidos para isolamento de protoplastos, dissolução de enzimas e lavagem dos protoplastos tem sido o CPW 13, uma solução salina de baixa viscosidade universalmente conhecida como CPW-Cell Washing Protoplasts (Frearson et al., 1973) e manitol a 13% (Dornelas & Vieira, 1993; D'Utra Vaz, 1993; Dornelas, 1995; Otoni, 1995; Passos et al., 2004).

A hibridação somática, por meio da fusão de protoplastos, também é uma técnica promissora para o melhoramento genético de espécies ornamentais e demanda protocolos de estabelecimento *in vitro*, organogênese e, muitas vezes, cultura de células em suspensão, bem estabelecidos. A hibridação somática é uma alternativa para a reprodução sexual, a fim de combinar (por meio de tratamentos químicos ou por eletro fusão) dois genomas completos, incluindo as organelas citoplasmáticas (Binsfeld, 1999). A hibridação somática permite inúmeras possibilidades para manipulações do genoma, tais como: (1) superação de incompatibilidades sexuais; (2) produção de anfidiplóides; (3) transferência de parte de um genoma de uma espécie para outra (cíbridos); (4) transferência do DNA citoplasmático para a produção de plantas macho-estéreis e (5) produção de plantas resistentes a estresses ambientais ou pragas e doenças (Binsfeld, 1999).

Em recente revisão, Davey et al. (2005) apresentam resultados positivos nos quais a fusão de protoplastos (simétrica ou assimétrica) colaborou para o melhoramento genético de diversas culturas economicamente importantes. Os autores enfatizam que os protoplastos fornecem também sistemas para investigar aspectos da genética e da fisiologia celular de plantas, incluindo estudos de genômica e proteômica.

Recursos técnicos, como fusão de protoplastos, visando à obtenção de híbridos somáticos interespecíficos podem ser de grande utilidade para o melhoramento genético de plantas ornamentais, à semelhança de programas de melhoramento genético importantes, como os de citros, girassol, brássicas e trigo, realizados no mundo inteiro (Davey et al., 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, da Universidade Federal de Lavras e no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizados como explantes folhas e pseudocaules de bastão-do-imperador obtidos *in vitro* e folhas de plantas em sistema hidropônico.

As plântulas *in vitro* se desenvolveram em meio de cultura composto com os sais básicos de MS (Murashige & Skoog, 1962), do complexo vitamínico do meio B5 (Gamborg et al., 1968), 3 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 3 % (p/v) de sacarose e 0,7 % (p/v) de ágar (Sigma Chemical Co., USA). O pH foi ajustado em 5,7±0,1, antes da autoclavagem. O meio foi distribuído em tubos de ensaio, contendo, aproximadamente, 20 mL de meio cada e vedados com filme plástico. Após o processo de autoclavagem e solidificação do meio, inoculou-se uma brotação por tubo. As culturas foram transferidas para sala de crescimento e mantidas sob irradiância de fótons de, aproximadamente, 36µmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 26±2°C e fotoperíodo de 16 horas.

As plantas em sistema hidropônico se desenvolveram em solução nutritiva Hoagland (1950), a 35% da sua força iônica, em casa de vegetação.

4.2 Isolamento de protoplastos

4.2.1 Isolamento de protoplastos de mesofilo de folhas *in vitro*

Utilizaram-se plântulas *in vitro*, de 30 a 45 dias de idade, para o isolamento de protoplastos (Figura 1A). Em câmara de fluxo laminar e sob condições assépticas, as plântulas tiveram suas folhas seccionadas paralelamente à nervura central, em tiras de 1 a 1,5 mm de largura (Figura 1 B). Foram, então, transferidas para placas de Petri de 60 X 15 mm, contendo 10 ml de solução CPW, testando-se três concentrações de manitol 0,5 M (9 g/100 mL CPW), 0,6 M (11g/100 mL CPW) e 0,7 M (13g/100 mL CPW (Frearson et al., 1973). Cerca de 1 g do material vegetal foi pré-plasmolisado nessa solução, durante uma hora, na ausência de luz. Em seguida, as soluções de CPW 0,5M ;0,6M e 0,7M foram descartadas com o uso de pipetas de Pasteur, sendo então adicionados 10 mL da mistura enzimática.

4.2.2 Isolamento de protoplastos a partir do pseudocaule de plantas *in vitro*

Pseudocauls foram seccionados transversalmente, para a obtenção de pequenos fragmentos de 50 mm de espessura (Figura 1 C e D) e foram transferidos para placas de Petri de 60 X 15 mm, contendo 10 mL de solução CPW, onde foram testadas três concentrações de manitol 0,5 M (9 g/100 mL CPW), 0,6 M (11g/100 mL CPW) e 0,7 M (13g/100 mL CPW (Frearson et al., 1973). Cerca de 1 g do material vegetal foi pré-plasmolisado nessa solução, durante uma hora, na ausência de luz. Em seguida, as soluções de CPW 0,5M; 0,6M e 0,7M foram descartadas com o uso de pipetas de Pasteur, sendo, então, adicionados 10 mL da mistura enzimática.

4.2.3 Isolamento de protoplastos a partir de mesofilo de folhas em sistema hidropônico

Folhas de plantas em sistema hidropônico (Figura 1E) foram excisadas a partir do pecíolo e as mesmas foram desinfestadas em solução de etanol 70% durante 2 minutos e, em seguida, mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio 40% durante 20 minutos, sendo depois enxaguadas por 5 vezes em água destilada autoclavada.

Para a obtenção dos protoplastos, as folhas tiveram a sua epiderme removida com o auxílio de uma pinça (*peeling*), para facilitar a infiltração da solução enzimática no tecido (Figura 1F). Depois, transferiu-se para placas de Petri de 60 X 15 mm, contendo 10 ml de solução CPW, onde foram testadas três concentrações de manitol 0,5 M (9 g/100 mL CPW), 0,6 M (11g/100 mL CPW) e 0,7 M (13g/100 mL CPW) (Frearson et al., 1973). Cerca de 1 g do material vegetal foi pré-plasmolisado nessa solução, durante uma hora, na ausência de luz. Em seguida, as soluções de CPW 0,5M, 0,6M e 0,7M foram descartadas com o uso de pipetas de Pasteur, sendo, então, adicionados 10 ml da mistura enzimática.

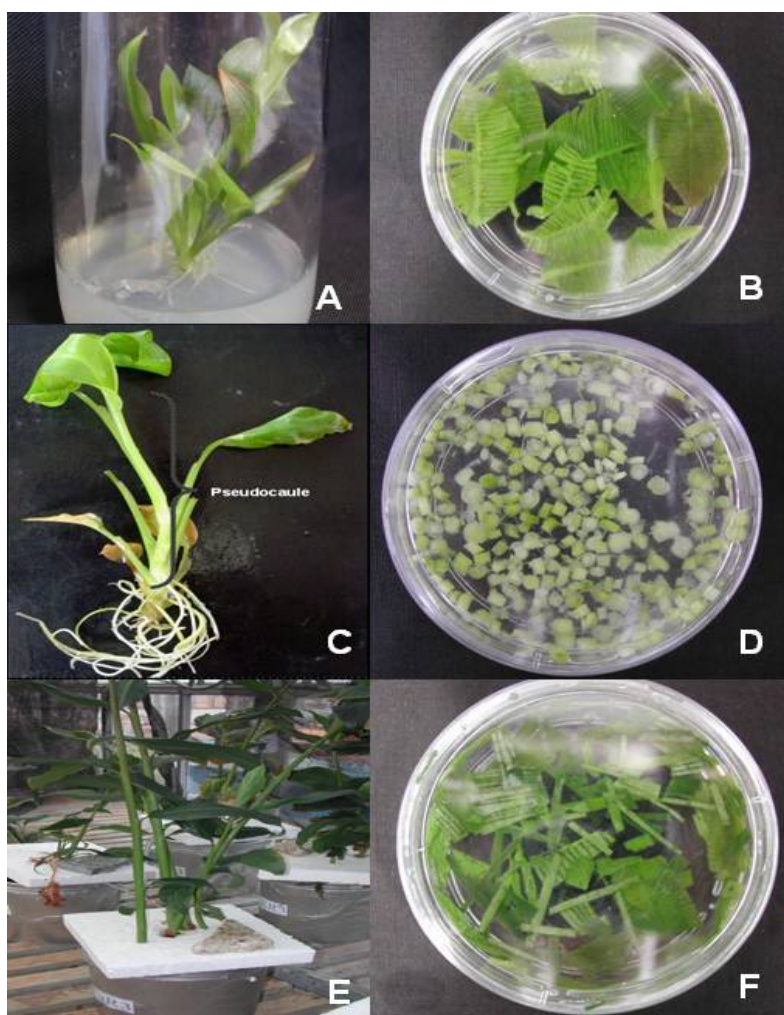


FIGURA 1. (A) Plântula de bastão-do-imperador *in vitro*. (B) Folhas de plântulas *in vitro* cortadas paralelamente à nervura central. (C) Pseudocaulis utilizado como fonte de explante. (D) Detalhe dos pseudocaulis seccionados. (E) Planta de bastão-do-imperador em sistema hidropônico. (F) Folhas de plantas hidropônicas seccionadas transversalmente a nervura central. UFLA, Lavras, MG, 2007.

4.3 Purificação

Após a fase de incubação, a suspensão obtida (protoplastos isolados e tecidos não digeridos) foi filtrada, utilizando-se peneira de náilon 64 μ m (Wilson Sieves, Nottingham, UK) e centrifugações a 700 rpm por 5 minutos (3x). O precipitado foi ressuspenso e transferido para novo tubo de centrífuga, sendo o volume completado com CPW 30S, 25S, 20S, 21S, 18S e 15S (gradiente de sacarose) e, então, centrifugado (700 rpm; 5 minutos).

Os protoplastos purificados, localizados na interface entre os dois meios, foram coletados com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferidos para a determinação do rendimento utilizando-se um hemacitômetro (Hausser Scientific, USA), sob microscópio ótico.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6x3 (6 soluções enzimáticas, três diferentes concentrações de manitol), sendo cada repetição constituída por uma placa de isolamento.

4.4 Avaliação das combinações enzimáticas no isolamento de protoplastos em diferentes tempos de incubação

Para o isolamento de protoplastos, cada explante foi submetido a seis diferentes combinações enzimáticas diluídas em três diferentes concentrações de manitol (0,5M, 0,6M e 0,7M) após o ajuste do pH 5,6: **Solução A** - 3% (p/v) de Cellulase “onozuka” R-10 (Yakult Honsha) + 1%(p/v) de Pectolyase (Seishim Pharmaceutical., USA) + 0,5% (p/v) de Driselase; **Solução B** - 3%(p/v) Cellulase “onozuka” R-10 + 1%(p/v) de Pectolyase + 1% (p/v) de Driselase (Sigma London Chemical Co Ltd); **Solução C** = 3,75% (p/v) Cellulase “RS” (Yakult Honsha) + 1% (p/v) de Driselase; **Solução D** - 2% (p/v) Rhozyme HP150 (Rohm & Haas Co., USA) + 1% (p/v) de Macerozyme R-10 + 0,5% (p/v) de Driselase; **Solução E** - 3% (p/v) de Cellulase onozuka R-10 + 2% (p/v) de Meicelase (Meiji Seika Haisha Ltd., Japan) + 1% (p/v) de Driselase; **Solução F** -

3% (p/v) de Cellulase *Aspergillus niger* (Fluka Chemicals Ltd) + 1%(p/v) de Pectinase *Aspergillus niger* (Fluka Chemicals Ltd). A todas as soluções enzimáticas foram acrescentados 5Mm de tampão MES (Sigma Chemical Co., USA) e 1% (p/v) de Dextran (Sigma Chemical Co., USA).

Todas as combinações enzimáticas foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 5 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi filtro-esterilizado com filtro Millipore[®], com membranas de 0,22 µm de diâmetro de poros e armazenadas a -20°C. A digestão da parede celular foi observada no período de 5-20 horas, sob agitação de 40 rpm ou estacionário à temperatura de 25°C no escuro. O isolamento de protoplastos foi monitorado a cada 5 horas, para verificar a eficiência de cada solução enzimática.

4.5 Avaliação dos diâmetros de protoplastos isolados a partir de diferentes explantes

Os diâmetros dos protoplastos obtidos dos diferentes explantes foram determinados mediante a captura de imagens com o auxílio de câmara digital (Canon Power Shot A710 7MP), as quais foram analisadas no programa Sigma Scan Pro 5[®]. Foi utilizada a objetiva de 40 x. Consideraram-se, no mínimo, 200 protoplastos de cada tecido vegetal, ressuspensos em solução CPW 9M. Os resultados foram expressos pela porcentagem de protoplastos da população pertencentes a cada categoria de diâmetro.

4.6 Avaliação da eficiência do sistema estacionário ou em rotação no isolamento de protoplastos de bastão-do-imperador

Para avaliar se a eficiência das soluções enzimáticas é influenciada pelo repouso ou o movimento (rotação 40 rpm), avaliou-se, dessa maneira, o número de protoplastos liberados em cada sistema. Utilizou-se a média de dois experimentos, a partir de 1,0 grama de matéria fresca. Ambos os sistemas permanecerem no escuro até o final de cada hora avaliada (5, 10, 15 e 20 horas).

4.7 Avaliação de concentrações de manitol no rendimento de protoplastos de bastão-do-imperador

Após a etapa final do processo de purificação, os protoplastos foram ressuspensos em 10 ou 15 mL de meio CPW 9M e duas ou três alíquotas, de 50 a 75 µL cada, amostras da população e transferidas para hematocítmetro Fuchs-Rosenthal-B.S. 74B (Weber Scientific Int. LTD., Sussex, U.K.) estabeleceu-se o número de protoplastos obtidos a partir da digestão enzimática de 1,0g de tecido. Média de duas repetições. As concentrações de manitol testadas foram: 0,5 M (9g/100 mL de CPW), 0,6M (11g/100 mL de CPW) e 0,7M (13g/100 mL de CPW).

4.8 Avaliação de concentrações de manitol na viabilidade de protoplastos de bastão-do-imperador

A viabilidade dos protoplastos foi determinada por meio da coloração com diacetato de fluoresceína (DAF) (Widholm, 1972). Uma mistura de volumes iguais de suspensão de protoplastos e da solução de DAF (0,01%) foi deixada em repouso por 3-5 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, observada sob luz UV (com filtro azul), utilizando microscópio invertido (Olympus IMT 2). Os protoplastos viáveis foram indicados por uma fluorescência verde e a viabilidade definida pela percentagem de protoplastos fluorescentes (Aditya & Baker, 2003). Para análise estatística, foi avaliada a porcentagem de protoplastos com fluorescência verde, em relação ao número de protoplastos total em campo de 40x, sob microscopia de fluorescência. Média da observação de, no mínimo, 200 protoplastos por repetição (2 repetições) e os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste SNK (5%) de separação de médias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação das combinações enzimáticas no isolamento de protoplastos de bastão-do-imperador, em diferentes tempos de incubação.

As combinações enzimáticas **A** - 3% Cellulase “onozuka” R-10 + 1% Pectolyase + 0,5% Driselase; **C** - 3,75% Cellulase “RS” + 1% Driselase; **D** - 3% Cellulase *Aspergillus niger* + 1% Pectinase *Aspergillus niger* e **F** - 3% Cellulase *Aspergillus niger* + 1% Pectinase *Aspergillus niger* não possibilitaram isolamento de protoplastos nos tempos de incubação testados, relacionados tanto com os diferentes tipos de tecidos como as concentrações de manitol testadas. Tempo de incubação inferior a 20 horas foi insuficiente para a digestão da parede celular.

Houve efeito diferenciado quanto às combinações enzimáticas, sobressaindo-se as soluções **E** e **B**.

Protoplastos foram obtidos a partir da digestão enzimática de folhas *in vitro* de *Etiligera elatior* var. Red Toch, ao serem empregadas as combinações enzimáticas E (3% de Cellulase “onozuka” + 2% de Meicelase + 1% de Driselase + em 0,6 M de manitol + 1% Dextran) e B (Cellulase “onozuka” R-10 + 1% Pectolyase + 1% Diselase em 0,6 M de manitol + 1% Dextran), obtendo-se $22,0 \times 10^5$ e $19,30 \times 10^5$ protoplastos por grama de matéria fresca, respectivamente em rotação de 40 rpm com um tempo de incubação de 15 horas (Tabela 1 e Figura 2).

TABELA 1: Eficiência no isolamento de protoplastos de bastão-do-imperador a partir de mesofilo de folhas obtidas *in vitro*, em função de diferentes soluções enzimáticas e tempos de incubação (média \pm desvio padrão).

Tempo de incubação (h)	Rendimento de protoplastos ^a ($\times 10^5$ /g MF)	
	B*	E**
5	0,38 \pm 0,18	1,87 \pm 0,73
10	3,23 \pm 0,61	13,76 \pm 1,22
15	12,30 \pm 1,26	22,00 \pm 2,37
20	9,25 \pm 2,45	19,5 \pm 1,51

B* 3% Cellulase “onozuka” R-10 + 1% Pectolyase + 1% Driselase em 0,6 M de manitol + 1% Dextran, pH 5,6.

E**3 % Cellulase “onozuka” R-10 + 2% Meicelase + 1% Driselase em 0,6 M de manitol +1% Dextran, pH 5,6.

^a Número de protoplastos obtidos a partir da digestão enzimática de 0,5g de tecido. Média de 2 experimentos.

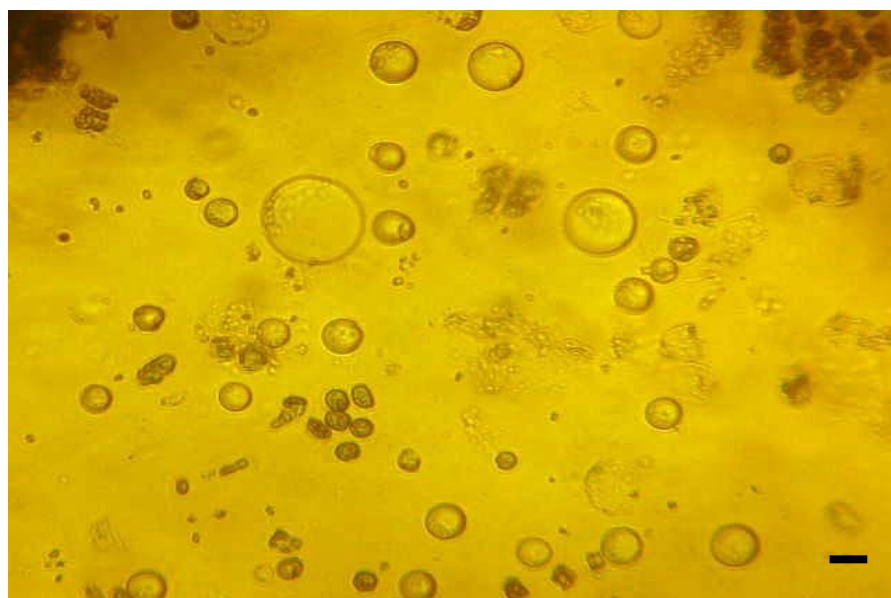


FIGURA 2. Protoplastos recém-isolados de bastão-do-imperador, após 15 horas de digestão enzimática na solução E (40x). UFV, Viçosa, MG, 2007. Barra 10 μ m.

Períodos superiores a 15 horas ocasionaram diminuição do rendimento, provavelmente devido à instabilidade da membrana plasmática e da não seletividade da solução enzimática. Resultados semelhantes foram obtidos por Costa et al. (2002), utilizando uma solução enzimática composta de 1% de Cellulase “onozuca” R-10 + 0,2% de Macerozyme R-10 e 0,1% de Driselase, com um rendimento de até $23,68 \times 10^6$ protoplastos/500g de calos em “ruby blood”, variedade de citrus.

Otoni (1995) verificou que folhas novas recém-expandidas, aliadas à eficiente atuação da enzima, possibilitaram a obtenção de rendimentos elevados de protoplastos. A incubação em CPW 13M (pré-plasmólise), por 60 minutos, é de fundamental importância para a obtenção de elevados rendimentos e viabilidade dos protoplastos.

Kanchanapoom et al. (2001) isolaram protoplastos de *Dendrobium pompadour* utilizando uma combinação enzimática composta por 1% Cellulase “onozuka” + 1% Macerozyme + 0,5% Driselase in 0,4 M manitol e obtiveram $22,0 \times 10^5$ (luz) e $21,70 \times 10^5$ (escuro) protoplastos por grama de tecido foliar, que mediam de 50 a 80 μm de diâmetro.

Benedito et al. (2000), trabalhando com isolamento de protoplastos de citros e utilizando a mesma solução utilizada por Costa et al. (2002), obtiveram 12×10^5 e 25×10^5 protoplastos /500 g de matéria fresca de calos das variedades de citrus ‘Bahia Cabula’ e ‘Orvalho de Mel’, respectivamente.

Os rendimentos (número de protoplastos isolados/grama de tecido) encontrados em diversos isolamentos de protoplastos em *Passiflora* variaram de acordo com a espécie e o explante utilizados, mas apresentaram amplitude de $9,2 \times 10^6$ - $1,4 \times 10^7$ protoplastos por grama de tecido (Dornelas & Vieira, 1993; D’Utra Vaz et al., 1993; Otoni, 1995; Passos et al., 2004).

5.2 Avaliação dos diâmetros de protoplastos isolados a partir de diferentes tecidos de bastão-do-imperador

Houve efeito diferenciado de acordo com o tipo de tecido em relação aos diâmetros médios dos protoplastos, 36,7; 27,6 e 32,28 μm , nos tecidos: folha *in vitro*, pseudocaule e folha em sistema hidropônico, respectivamente (Tabela 2).

TABELA 2: Diâmetro dos protoplastos de bastão-do-imperador a partir de três explantes (média \pm desvio padrão). Cellulase “onozuka” R-10 + 2% Meicelase + 1% Driselase + 1% Dextran, 0,6 M, pH 5,6.

Tipo de tecido	Diâmetro médio ^a
Folha <i>in vitro</i>	36,7 \pm 6,4
Pseudo caule	27,6 \pm 3,4
Folha hidropônica	32,28 \pm 5,2

^a Média de 200 repetições de 2 experimentos.

Rodríguez & Dallos (2004), ao isolarem protoplastos de mesofilo de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*, observaram diâmetros diferentes com relação ao tipo de tecido usado, para folhas um diâmetro médio de 19,45 \pm 0,50 μm e os de cotilédones apresentaram diâmetro médio de 28,90 \pm 0,62 μm .

Oliveira et al. (1995), isolando protoplastos de tangerina Cleópatra e limoeiro Cravo, observaram que os diâmetros variaram de 4,8 a 16,8 μm , respectivamente. Segundo Zimmermann & Schevrich (1981), o conhecimento do diâmetro dos protoplastos é importante em trabalhos de fusão usando o método de eletrofusão, pois existe uma relação inversa entre o diâmetro e a voltagem necessária para a fusão dos protoplastos.

De acordo com Dornelas et al. (1995), o tamanho médio dos protoplastos depende da espécie analisada e do explante utilizado. Podem variar de 19 a 47µm, quando isolados de tecidos de folhas, ou de 30 a 60µm, quando derivam de tecidos cotiledonares.

Segundo Ochatt & Power (1992), protoplastos obtidos de mesofilo de dicotiledôneas tendem a ser menores do que aqueles isolados de calos ou suspensões celulares. Em monocotiledôneas, os protoplastos são, em geral, inferiores a 30 µm, independente da fonte do tecido, portanto, contrários aos resultados obtidos e que podem ser comprovados na (Tabela 2).

A caracterização dos protoplastos quanto ao diâmetro é um pré-requisito para o sucesso na manipulação dos protoplastos no contexto da fusão e ou subsequente seleção de heterocariontes pela citometria de fluxo. Existe, ainda, relação entre tamanho do protoplasto e a sua capacidade de responder a estímulos elétricos, tanto em termos de aspectos que envolvam a transformação por absorção de DNA exógeno por eletroporação, como em termos do incremento pelo estímulo elétrico das respostas dos protoplastos em cultura (Ochatt & Power, 1992).

5.3 Avaliação da eficiência do sistema estacionário ou em rotação no isolamento de protoplastos de bastão-do-imperador

Protoplastos foram obtidos de folhas desenvolvidas *in vitro*, utilizando a combinação enzimática E 3% de Cellulase + 2% de Meicelase + 1% de Driselase + 1% Dextran no sistema de rotação contínua (40 rpm). Esse sistema foi o mais eficiente, isolando $22,0 \times 10^5$ protoplastos por grama de matéria fresca (Tabela 3).

Matos et al. (2005) verificaram que folhas desenvolvidas *in vitro* e incubadas no escuro em rotação de 40 rpm influenciaram o rendimento de protoplastos de *Passiflora edulis*. Os mesmos autores ainda relatam que

explantes retirados de plantas cultivadas em casa de vegetação são também indicados, isolamento de maiores quantidades de protoplastos.

Resultados expressivos foram obtidos por Monteiro et al. (2003), quando realizou isolamento de protoplastos em alfafa (*Medicago sativa*), testando o sistema de rotação contínua (35 rpm) e em condições de escuro. Esses autores obtiveram maiores rendimentos e concluíram que os mais elevados rendimentos quando a rotação e o recobrimento da placa de isolamento eram realizados.

TABELA 3: Eficiência no isolamento de protoplastos de bastão-do-imperador com rotação (40 rpm no escuro) ou estacionário (escuro). 3% Cellulase “onozuca” R-10 + 2% Meicelase + 1% Driselase em 0,6 M de manitol nos vários tempos de incubação (média ± desvio padrão).

Tempo de incubação (h)	Rendimento de protoplastos ^a (x10 ⁵ /g MF)	
	ES*	R**
5	4,53 ± 0,32	4,87 ± 0,73
10	15,20 ± 0,48	15,75 ± 1,22
15	20,30 ± 0,26	22,00 ± 1,37
20	19,25 ± 0,45	19,74 ± 0,51

* Estacionário (escuro) ** Rotação (40 rpm no escuro)

^a Número de protoplastos obtidos a partir da digestão enzimática de 1,0g de tecido. Média de 2 experimentos.

5.4 Avaliação de diferentes concentrações de manitol no rendimento de protoplastos de bastão-do-imperador

Em relação às concentrações de manitol empregadas, o melhor resultado foi obtido quando se utilizou manitol a 0,6M (11g/100 mL), com eficiência de $19,95 \times 10^5$ protoplastos por grama de matéria fresca, apresentando viabilidade de 96,7% (Tabela 4 e 5).

Na literatura, observa-se predominância quanto ao uso de uma solução mais concentrada de manitol a 0,7M (13g/100 mL), o que aumenta ainda mais a estabilidade da membrana plasmática.

TABELA 4: Eficiência no isolamento de protoplastos de bastão-do-imperador a partir de mesofilo de folhas obtidas *in vitro*, em função de três concentrações de manitol em diferentes tempos de incubação (média \pm desvio padrão). 3% Cellulase “onozuca” R-10 + 2% Meicelase + 1% Diselase +1% Dextran, pH 5,6.

Tempo de incubação (h)	Rendimento de protoplastos ^a ($\times 10^5$ /g MF)		
	0,5*	0,6**	0,7***
5	1,38 \pm 0,18	4,29 \pm 1,73	4,24 \pm 2,75
10	5,21 \pm 0,61	13,76 \pm 3,22	12,2 \pm 3,12
15	12,30 \pm 1,26	19,95 \pm 3,37	16,45 \pm 3,75
20	15,65 \pm 2,45	19,21 \pm 2,51	17,33 \pm 1,75

* Manitol 0,5M (9 g/100 mL de CPW) ** Manitol 0,6M (11 g/100 mL de CPW)
*** 0,7M (13 g/100 mL de CPW)

^a Número de protoplastos obtidos a partir da digestão enzimática de 1,0g de tecido. Média de 2 experimentos.

A solução comumente utilizada para pré-plasmólise dos tecidos de *Passiflora*, dissolução de enzimas e lavagem dos protoplastos é CPW 13, composta pelos sais do meio CPW (Frearson et al., 1973) e manitol a 13%

(Dornelas & Vieira, 1993; D'Utra Vaz, 1993; Dornelas et al., 1995; Otoni, 1995; Passos et al., 2004).

Matsumoto (2006), verificando a eficiência de manitol a 0,6M e a 0,7M no isolamento de protoplastos de banana, concluiu que o rendimento de protoplastos era aumentado quando a pré-plantólise e a incubação eram realizadas em manitol a 0,6 M.

5.5 Avaliação de diferentes concentrações de manitol na viabilidade de protoplastos de bastão-do-imperador

As maiores porcentagens de viabilidade obtidas logo após a purificação dos protoplastos foi alcançada em manitol 0,6M e 0,5 M, com 96,7% e 81,8% des protoplastos viáveis, respectivamente (Tabela 5).

TABELA 5: Viabilidade no isolamento de protoplastos de bastão-do-imperador a partir de mesofilo de folhas obtidas *in vitro*, em função de três concentrações de manitol em diferentes tempos de incubação (média \pm desvio padrão). 3% Cellulase “onozuka” R-10 + 2% Meicelase + 1% Diselase +1% Dextran, 0,6 M, pH 5,6.

Manitol	Viabilidade ^b
0,5 M	81,8 \pm 2,7
0,6 M	96,7 \pm 3,9
0,7M	30,2 \pm 1,2

^b Porcentagem de protoplastos com fluorescência verde, em relação ao número de protoplastos total em campo de 40x, sob microscopia de fluorescência. Média da observação de, no mínimo, 200 protoplastos por repetição (2 repetições)

Kanchanapooma et al. (2001). realizando isolamento de protoplastos de *Dendrobium pompadour*, testaram três diferentes concentrações de manitol (0,4M; 0,5M e 0,6M) e observaram que a concentração de 0,4M apresentava

isolamento de $19,89 \times 10^5$ protoplastos, superior às demais concentrações, $13,59 \times 10^5$ e $6,95 \times 10^5$, respectivamente em um período de incubação de 3 horas. Maiores viabilidades (89%) foram alcançadas em manitol 0,4M.

O estudo da viabilidade após isolamento tem grande importância na determinação da densidade de plaqueamento a ser utilizada no cultivo de protoplastos, uma vez que essa variável tem influência nos seus processos de divisões e diferenciação.

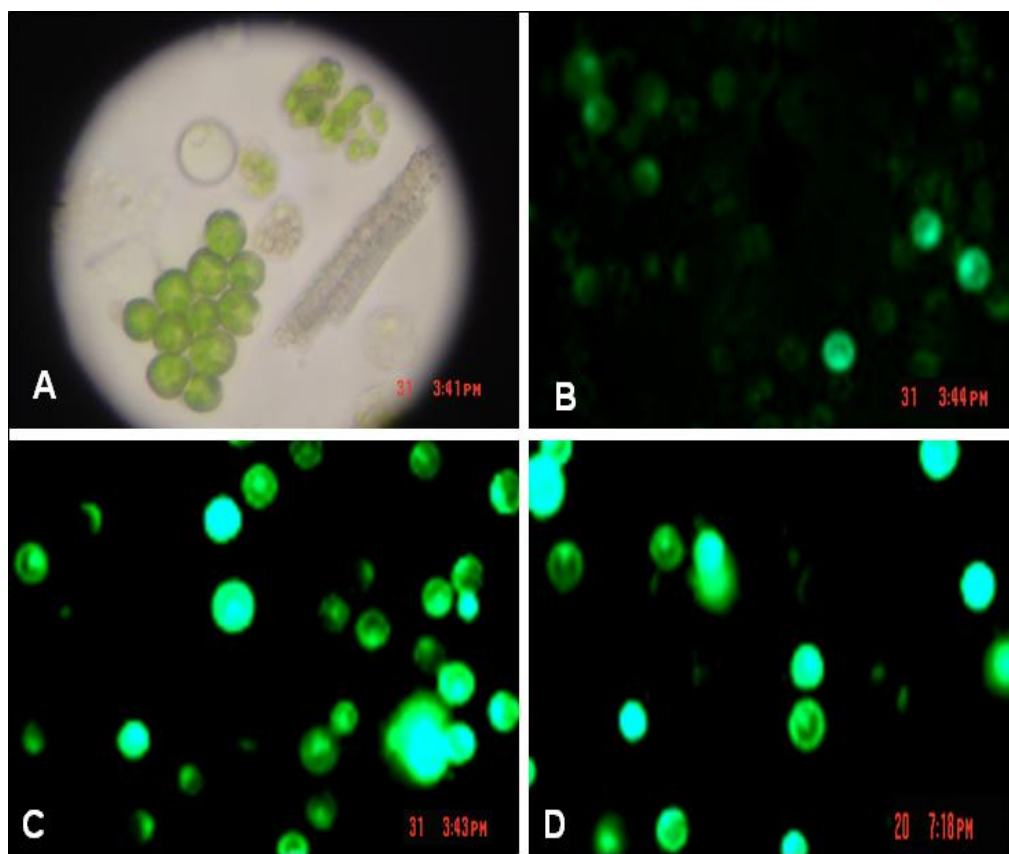


FIGURA 3. (A) Protoplastos recém-isolados. (B) Teste de viabilidade em manitol 0,7M. (C) Teste de viabilidade em manitol 0,6 M. (D) Teste de viabilidade em manitol 0,5 M. Em todos os testes de viabilidade, o isolamento de protoplastos foi efetuado na solução enzimática composta de 3% Cellulase “onozuca” R-10 + 2% Meicelase + 1% Driselase +1% Dextran.

6 CONCLUSÃO

A solução enzimática composta de 3% de Cellulase Onozuca R-10, 2% de Meicelase e 1% de driselase, com 15 horas de incubação, em manitol 0,4M, em sistema rotatório (40 rpm) no escuro é a mais adequada para o isolamento de protoplastos de bastão-do-imperador.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, L. M. G.; CARNEIRO, V. T. C. Eletroporação de protoplastos. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEM, 1998. p. 37-47.
- BENEDITO, V. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J. Calogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos de laranja-doce. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 1, p. 33-38, 2000.
- BINSFELD, P. C. **Production and characterization of interspecific transgenic plants in the genus *Helianthus* using microprotoplast technique**. Göttingen: Cuvillier Verlag, 1999.
- CARNEIRO, V. T. C.; CONROI, T.; BARROS, L. M. G.; MATSUMOTO, K. Protoplasto: cultura e aplicações. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Org.). **Cultura de tecidos vegetais e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p.413-458.
- COSTA, M. A. P. C.; M. FILHO, F. A. A; MENDES, B. M. J. Isolamento e eficiência de plaqueamento de protoplastos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, ago. 2002.
- DAVEY, M. R.; ANTHONY, P.; POWER, J. B.; LOWE, K. C. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 131-171, 2005.
- DORNELAS, M. C.; TAVARES, F. C. A.; OLIVEIRA, J. C. de; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplast fusion in *Passiflora* ssp. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 106- 110, 1995.

- DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplasts cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 103-106, 1993.
- D'UTRA VAZ, F. B.; SANTOS, A. V. P.; MANDERS, G.; COCKING, E. C.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* fv. *flavicarpa* Deg.): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 220-225, 1993.
- FREARSON, E. M.; POWER, J. B.; COCKING, E. C. The isolation, culture, and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. **Developmental Biology**, San Diego, v. 33, p. 130-137, 1973.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of *Soybean* root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.
- GELVIN, S. B. 'The introduction and expression of transgenes in plants'. **Current Opinion Biotechnology**, v. 9, p. 227-232, 1998.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950.
- KANCHANAPOOMA K.; JANTAROB, S.; RAKCHADB, D. Isolation and fusion of protoplasts from Mesophyll Cells of *Dendrobium Pompadour*. **Science Asia**, n. 27, p. 29-34, 2001.
- LAMAS, A. M. **Floricultura tropical: técnicas de cultivo**. SEBRAE – PE, 2002. p. 84.
- MATOS, G. V. C.; PASSOS, I. R. S.; BINSFELD, P. C.; DORNELAS, M. C.; SCOTT, M. D. S.; SAWASAKI, H. E.; MELETTI, L. M. M.; BERNACCI, L. C. Hibridação somática em *Passiflora* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 2005.
- MATSOMOTO, K. **Suspensão celular -focalizando a bananeira**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 24. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 126).
- MONTEIRO, M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VALARINI, M. J.; OLIVEIRA, C. A. de; VIEIRA, M. L.C. Plant regeneration from protoplasts of alfalfa (*Medicago sativa*) via somatic embryogenesis. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 4, p. 683-689, Oct./Dec. 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

OCHATT, S. J. Power, J. B. 1992. Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. In plant biotechnology. Comprehensive Biotechnology, 2nd suppl., p. 99-127.

OLIVEIRA, R. P. de; MENDES, B. M. J.; D'UTRA VAZ, F. B.; TULMANN NETO, A. Isolamento e cultivo de protoplastos de porta-enxertos de citros. **Sciencia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, May/Aug. 1995.

OTONI, W. C. **Hibridização e embriogênese somática e transformação genética em espécies de *Passiflora***. 1995. 198 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PASSOS, I. R. S.; MATOS, G. V. C.; BINSFELD, P. C.; ROSALES, M. B.; SCOTT, M. D. S.; SAWASAKI, H. E.; MELETTI, L. M. M.; BERMACCI, L. C.; SIQUEIRA, W. J. Protoplasts: isolation, culture and plant regeneration in species of the genus *Passiflora*. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOLOGIA CELULAR, 12., CONGRESSO DA SOCIEDADE IBEROAMERICANA DE BIOLOGIA CELULAR, 9., 2004, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Iberoamericana de Biologia Celular, 2004.

ZIMMERMANN, V.; SCHEVRICH, P. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. **Planta**, Heidelberg, v. 151, p. 26-32, 1981.

CAPÍTULO 4

ACLI MATI Z A Ç Ã O E ASPECTOS ANATÔMICOS DE BASTÃO-DO- IMPERADOR UTILIZANDO DIFERENTES SOLUÇÕES NUTRITIVAS

1 RESUMO

SILVA JÚNIOR, Jessé Marques. Aclimatização e aspectos anatômicos de bastão-do-imperador utilizando diferentes soluções nutritivas. In: _____. [*Etligera elatior* (Jack) R. M. Smith]: propagação *in vitro*, anatomia e obtenção de protoplastos 2007. Cap. 4, p.73-104. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O presente estudo teve como objetivos estabelecer uma metodologia de aclimatização para as plântulas de bastão-do-imperador cultivadas *in vitro* e, ainda, comparar a estrutura interna de folhas submetidas a diferentes soluções nutritivas. Para a aclimatização, plântulas de bastão-do-imperador diretamente retiradas do cultivo *in vitro* foram plantadas em bandejas com substrato inerte (vermiculita expandida + 10% de areia), onde permaneceram em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e irradiância de fótons de $67 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Fez-se o controle da umidade com o auxílio de um saco plástico transparente, o qual foi retirado após 15 dias e, logo em seguida, iniciaram-se os experimentos com a utilização das soluções nutritivas MS (Murashige & Skoog, 1962), BJ (Bolle-Jones, 1954) e HO (Hoagland & Arnon, 1950), a 35% de sua força iônica. Para o estudo anatômico, cortes transversais e paradérmicos foram realizados nas lâminas foliares de plântulas *in vitro*, em período de aclimatização e em plantas em campo. As plântulas desenvolvidas *in vitro* apresentaram 100% de sobrevivência. Nas secções transversais paradérmicas das lâminas foliares de bastão-do-imperador, observaram-se diferenças anatômicas entre as plântulas submetidas a diferentes ambientes. As epidermes abaxial e adaxial apresentaram diferenças significativas nos ambientes em que as plântulas se desenvolveram, mostrando-se mais espessas à medida que ia se prolongando o tempo de aclimatização. As médias das espessuras do parênquima paliçádico não diferiram estatisticamente, tanto nos períodos de aclimatização quanto nas diferentes soluções nutritivas testadas. Já o parênquima esponjoso apresentou diferenças significativas em relação às soluções nutritivas testadas, evidenciadas em todas

* Comitê de orientação: Ranato Paiva, PhD (Orientador), Dr. Wagner Campos Otoni (Co-orientador); Dr^a. Patricia Duarte de Oliveira Paiva (Co-Adviser).

as avaliações. A solução MS foi a que mais contribuiu para o desenvolvimento das estruturas internas da folha (parênquima esponjoso e cilindro vascular central). Maior densidade estomática foi observada nas plântulas desenvolvidas *in vitro* (250 estômatos por mm²), comparadas às já aclimatizadas ou, até mesmo, com a de campo, com 200 e 190 estômatos por mm², respectivamente. Os estômatos das folhas de bastão-do-imperador desenvolvidas *in vitro* apresentaram diâmetros polar e equatorial maiores que os estômatos das folhas de plântulas já aclimatizadas e de campo.

2 ABSTRACT

ACCLIMATIZATION AND ANATOMICAL ASPECTS OF BASTÃO-DO- IMPERADOR USING DIFFERENT NUTRITIVE SOLUTION

SILVA JÚNIOR, Jessé Marques. Aclimatização e aspectos anatômicos de bastão-do-imperador utilizando diferentes soluções nutritivas *In: _____* [Etliger *elatior* (Jack) R. M. Smith]: Propagation *in vitro*, anatomy and obtainment of protoplasts 2007. Cap. 4, p.73-104. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

This study aimed to establish a methodology of acclimatization for the plants of bastão-do-imperador cultivated *in vitro* and also compare the internal structure of the leaves submitted to different nutritional solutions. For the acclimatization, plants of bastão-do-imperador directly taken from the *in vitro* cultivation were planted in trays with inert substrate (expanded vermiculit + 10% of sand), where they stayed at a growth room with controlled temperature of $25 \pm 2^\circ \text{C}$ and irradiance of photons of $67 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The control of humidity was done with a transparent plastic bag, which was taken off after 15 days and in sequence the experiments were initiated using the MS nutritive solutions (Murashige & Skoog, 1962), BJ (Bolle-Jones, 1954) and HO (Hoagland & Arnon, 1950) with 35% of its ionic force. For the anatomical study, transversal and paradermal cuts were done at the leaves of *in vitro* plants, during the period of acclimatization and in plants from the field. The plants developed *in vitro* presented 100% of survival. At the paradermic transversal sections of the leaves of bastão-do-imperador, anatomical differences were observed between the plants submitted to different environments. The epidermis abaxial and adaxial presented significant differences at the environments where the plants developed, showing more thickness along the acclimatization time. The averages of the thicknesses of the palisade parenchyma did not differ statistically during the period of acclimatization and according to the nutritive solutions tested. Already the spongy parenchyma presented significant differences in relation to the tested nutritive solutions, evidencing in all the evaluations that the solution MS was most effective for the development of the internal structures of the leaf (spongy parenchyma and central vascular cylinder). A bigger stomata density was observed in plants developed *in vitro* (250 stomata for mm^2) if compared to the ones already acclimatized or even though with the ones from the field, 200 and

*Guidance Committee: Ranato Paiva, PhD (Adviser), Dr. Wagner Campos Otoni (Co Adviser); Dr^a. Patricia Duarte de Oliveira Paiva (Co-Adviser).

190 stomata for mm^2 respectively. The stomata of leaves of bastao-do-imperador developed *in vitro* presented polar and equatorial diameters bigger than the stomata of leaves of plants already acclimatized and from the field.

3 INTRODUÇÃO

O bastão-do-imperador, também conhecido por gengibre-tocha ou flor-da-redenção, é uma planta ornamental ainda pouco difundida no mercado de flores, mas com excelentes perspectivas de comercialização, principalmente como flor para corte, podendo também ser utilizado na composição paisagística.

A importância principal desse grupo taxonômico está em sua popularidade como plantas ornamentais e pelas suas inflorescências chamativas, sendo essa uma característica muito importante para distingui-las no campo. Seu crescimento é em forma de “touceiras”, aglomeradas, dessa maneira protegendo os novos brotos que nascem a partir dos rizomas. Também são aproveitadas em projetos paisagísticos, promovendo arte e graça nos jardins modernos, sendo ainda utilizadas para formar caminhos laterais às entradas.

Especificamente para mudas de bastão-do-imperador obtidas cultivo *in vitro* utilizando soluções nutritivas, existem poucos estudos que indiquem a solução nutritiva ideal para o cultivo, ou seja, a solução que possua os nutrientes de forma balanceada e que promovam as alterações anatômicas necessárias, como maior lignificação dos tecidos, que é um aspecto decisivo na capacidade de aclimatização da espécie supracitada, exposta a diferentes condições de ambiente. Dentre as soluções existentes, se destacam: Hoagland & Arnon (Neves et al., 2005), Bolle Jones (Santos et al., 2005) e MS (T. Neto et al., 2004).

Essa etapa, entretanto, pode chegar a ser um fator limitante no processo da micropropagação (Grattapaglia & Machado, 1998). Portanto, para uma melhor resposta na aclimatização, deve-se proporcionar alta umidade relativa do ar, baixa irradiação e temperatura amena (Debergh, 1991). Além disso, as raízes produzidas *in vitro* são pouco funcionais, razão pela qual devem ser substituídas o mais rápido possível, o que só ocorrerá mantendo-se a planta com baixa transpiração. Por outro lado, George (1996) observou que raízes formadas *in*

vitro não se desenvolvem adequadamente, para muitas espécies micropropagadas.

Para Brained & Fuchigami (1981), a aclimatização das plantas provenientes da cultura *in vitro* é uma das etapas com maior risco de perdas, porque as plantas são sensíveis e tenras, pois não desenvolvem a cutícula, resultando em alta transpiração, e sua parede celular não apresenta rigidez suficiente para a sustentação. Ainda, as folhas são delgadas, apresentando menores taxas fotossintéticas, provocando estresse nas plantas quando são transferidas para o ambiente *ex vitro*.

Alterações na estrutura interna foliar constituem aspectos decisivos na capacidade de aclimação das espécies expostas a diferentes condições de ambiente (Hanba et al., 2002; Schluter et al., 2003).

Um fator de elevada importância na aclimatização é o substrato que, de acordo com suas propriedades, pode facilitar ou impedir o enraizamento e o crescimento das plântulas (Calvete et al., 2000). Substratos hortícolas para a produção de mudas estão substituindo o uso de solo mineral, propiciando significativos aumentos na produção (Bellé & Kämpf, 1993).

A escolha do substrato apropriado pode ser decisivo para a aclimatização. O substrato deve ser de baixa densidade, rico em nutrientes, de composições química equilibrada e física uniforme, com boa aeração e drenagem, boa coesão entre as partículas e raízes, e estar, preferencialmente, isento de plantas daninhas e com boa flora bacteriana (Coutinho & Carvalho, 1983).

Dentre os materiais passíveis de utilização na elaboração de substratos, destacam-se casca de arroz carbonizada, Plantmax® (Fráguas et al., 2007) e vermiculita expandida (Silva et al., 2003).

Considerando que o bastão-do-imperador é uma espécie ainda pouco difundida, mas com enorme potencial como flor de corte e a ausência de

literaturas sobre a sua anatomia foliar, aclimatização e o uso de soluções nutritivas, o presente trabalho foi realizado com os objetivos de estabelecer uma metodologia de aclimatização para as plântulas de bastão-do-imperador cultivadas *in vitro* e analisar caracteres anatômicos durante a aclimatização, utilizando diferentes soluções nutritivas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Biologia, Setor Fisiologia Vegetal e no Laboratório de Anatomia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

4.1 Material vegetal e condições de cultivo

Utilizaram-se plântulas micropropagadas de bastão-do-imeperador var. Red Torch (com cerca de 8 cm de comprimento). As plântulas foram obtidas por meio do enraizamento e alongamento *in vitro* de brotações axilares em meio basal de MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 3 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 6 g.L⁻¹ de ágar e pH 5,8±0,1. Para o cultivo, foram utilizados tubos de ensaio contendo 10 mL de meio com apenas uma brotação por tubo, sendo os mesmos vedados com filme plástico transparente e mantidos em câmara de crescimento sob irradiância de fótons de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, proveniente de lâmpadas frias Philips TDL, em fotoperíodo de 16 horas e à temperatura de 25± 2°C.

4.2 Aclimatização *ex vitro*

Plântulas obtidas por meio de micropropagação (Capítulo 2), com 90 dias de idade, foram transferidas diretamente para bandejas contendo substrato vermiculita + 10% de areia e envoltas com saco plástico transparente por 15 dias, para a manutenção da umidade relativa no ambiente. A bandeja foi mantida em sala de crescimento à temperatura controlada de 25± 2°C e irradiância de fótons de 67 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Passado este período, a câmara úmida foi removida e, em seguida, iniciaram-se os experimentos com o uso de três soluções nutritivas, MS

(Murashige & Skoog, 1962), Bolle & Jones (1954) e Hoagland & Arnon (1950) a 35% da força iônica, irrigando essas plântulas uma vez por semana. Cada tratamento era composto por 20 plântulas.

Durante 60 dias de aclimatização, duas avaliações eram realizadas, por mês, para verificar o número de estômatos, abertura dos estômatos, espessura do parênquima paliçádico, parênquima lacunoso, epiderme abaxial e adaxial e diâmetro do feixe central.

4.3 Estudos anatômicos

As avaliações anatômicas foram conduzidas por meio de observações efetuadas em secções paradérmicas (da face adaxial), obtidas à mão livre, com auxílio de lâmina de aço inox (Gillette®). Para a obtenção dos cortes, foi utilizado o terço médio da segunda folha expandida (direção ápice-base), coletadas de diferentes plantas de cada tratamento e previamente fixadas em FAA 70 (formaldeído, ácido acético e álcool etílico) (Johansen, 1940), por 72 horas e conservadas em álcool etílico 70% (v/v). Quanto à preparação, as secções foram primeiramente clarificadas em solução de hipoclorito de sódio (50% v/v), submetidas à tríplex lavagem em água destilada, coloradas com safranina 1% e montadas em lâminas utilizando água glicerinada.

A partir dessas secções, as variáveis analisadas foram densidade estomática (nº de estômatos por mm²), diâmetros polar e equatorial dos estômatos.

As secções transversais foram utilizadas para a realização de medições de espessura das epidermes (adaxial e abaxial) e dos parênquimas paliçádico lacunoso. Para tanto, utilizaram-se 5 folhas com 4 cortes avaliados por folha (repetição), num total de 20 observações para as variáveis densidade estomática e 6 folhas com 4 cortes avaliados para as variáveis diâmetros polar (DP) e equatorial (DE) e a relação DP/DE, num total de 24 observações. O mesmo

número de repetições foi utilizado para os cortes transversais. Todas as variáveis analisadas foram obtidas por meio de medições efetuadas no programa Sigma scan pro 5[®].

4.4 Descrição dos tratamentos

Os tratamentos consistiram de quatro tipos de folhas, assim descritos: T1– folhas de plantas ao final da fase de enraizamento *in vitro*; T2 – folhas persistentes (formadas *in vitro*) de plantas com 30 dias de aclimatização; T3 – novas folhas formadas *ex vitro* de plantas com 45 dias de aclimatização (folhas de transição) e T4 – novas folhas de plantas com 60 dias de aclimatização. Para pleno controle das folhas dos tratamentos (T2) e (T4) efetuou-se marcação com fitilhos de cores distintas.

4.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

Para o experimento de anatomia utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 5 repetições. A análise dos dados foi feita com o software Sisvar (Ferreira, 2000), utilizando-se o teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Aclimatização *ex vitro*

O número de plantas sobreviventes nas três soluções nutritivas foi de 100%, ou seja, todas as soluções nutritivas testadas, aliadas ao substrato, foram eficientes em proporcionar um ambiente favorável ao desenvolvimento de plântulas de bastão-do-imperador, após 60 dias (Figura 1 A e B).

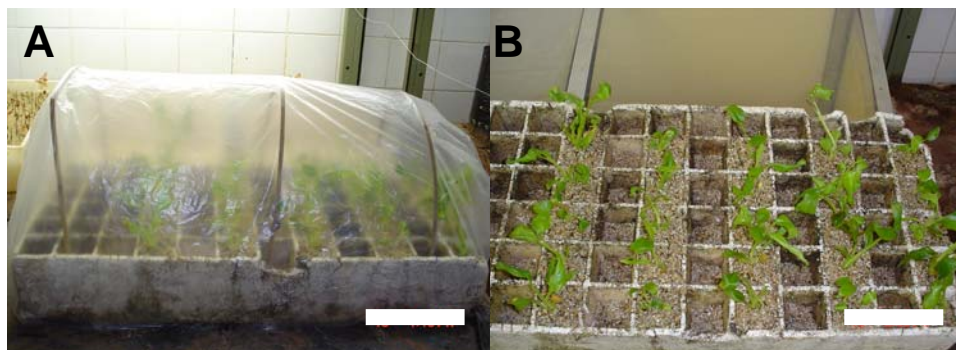


FIGURA 1. (A) Miniestufa adaptada para a aclimatização. (B) Aspecto geral da aclimatização de plântulas de bastão-do-imperador em bandeja com vermiculita + 10% de areia. Barras 10 cm. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Resultados semelhantes foram encontrados por Bosa et al. (2003). Reailizando a aclimatização de plântulas de *Gypisophila paniculata*, uma espécie ornamental, utilizando o mesmo substrato e a solução Bole Jones, esses autores obtiveram taxas de sobrevivência entre 90% a 98%.

Maciel et al. (2000), avaliando a aclimatização de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha* Wendl.), encontraram sobrevivência de 100% com o mesmo substrato utilizado neste trabalho.

As folhas de bastão-do-imperador proveniente do campo apresentaram organização dorsiventral e hipostomática (Figura 2A). A epiderme adaxial é bisseriada, enquanto a abaxial é unisseriada (Figura 2A), com células de forma e dimensões variáveis. As maiores dimensões são observadas na face adaxial. O mesofilo é representado por uma ou duas camadas de parênquima paliçádico, de células alongadas justapostas e as células do parênquima lacunoso frouxamente arranjadas, com 5 a 6 camadas e poucos espaços intercelulares (Figura 7A).

Na nervura central, o sistema vascular é constituído por feixes colaterais fechados de 8 a 10, e se observa a formação de feixes acessórios (Figura 2B).

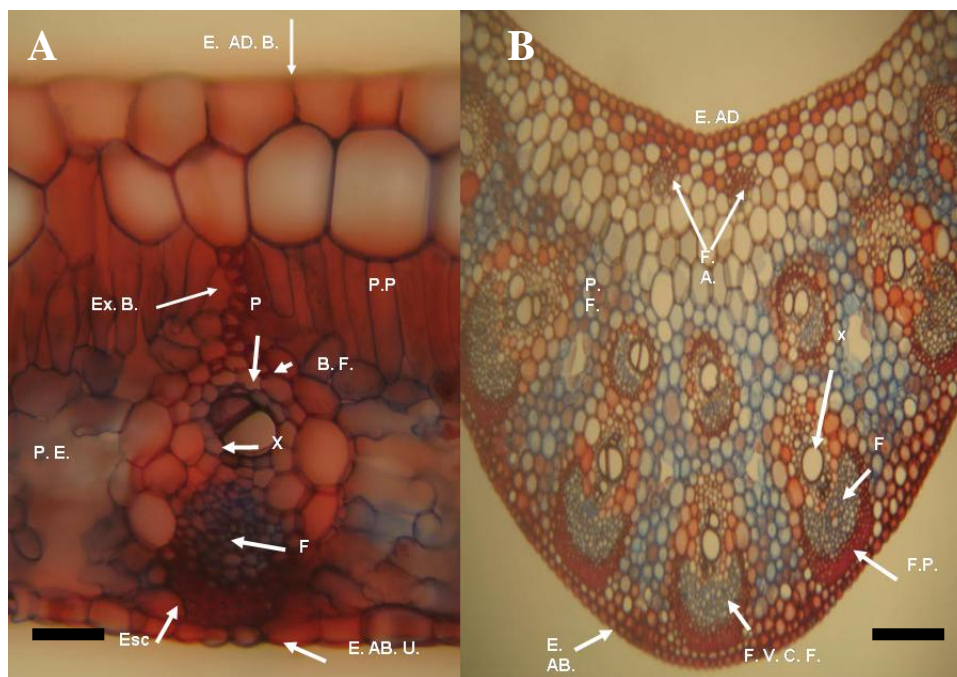


FIGURA 2. (A e B) Seções transversais obtidas do limbo foliar de plantas de *Eligera elatior* var. Red Torch em campo (40 x). A. E.AD. B-epiderme adaxial bisseriada; PP- parênquima paliçádico; BF- bainha foliar (endoderme); P- periciclo; X- xilema; F- floema; E.AB.U- epiderme abaxial uniestratificada; Esc- esclerênquima; PE- parênquima esponjoso; Ex B- extensão da bainha. B.E.AD-epiderme adaxial; FA- feixes acessórios; X-xilema; F-floema; FP- fibras perivasculares; FVCF- feixe vascular colateral fechado; E.EB- epiderme abaxial; PF- parênquima fundamental. UFLA, Lavras, MG, 2007. Barras 50 µm.

Na Figura 3, secção transversal do limbo foliar, os tecidos apresentam-se pouco diferenciados em relação às plantas cultivadas no campo. Nota-se que a nervura mediana possui em torno de três feixes vasculares colaterais e não evidência feixes acessórios. No campo, a planta possui dois feixes acessórios e de 8 a 10 feixes vasculares colaterais. *In vitro*, a organização dos tecidos segue os padrões observados em campo, como anatomia dorsiventral apresentando

parênquima paliçádico na face superior da lâmina (adaxial) e parênquima esponjoso na face inferior (adaxial), e são hipoestomáticas.

De acordo com Menezes et al. (2003), em espécies com mesofilo dorsiventral, a grande maioria dos cloroplastos é encontrada nas células do parênquima paliçádico. Devido à sua forma e ao arranjo dessas células, os cloroplastos podem se dispor paralelamente às paredes celulares, aumentando a eficiência fotossintética.

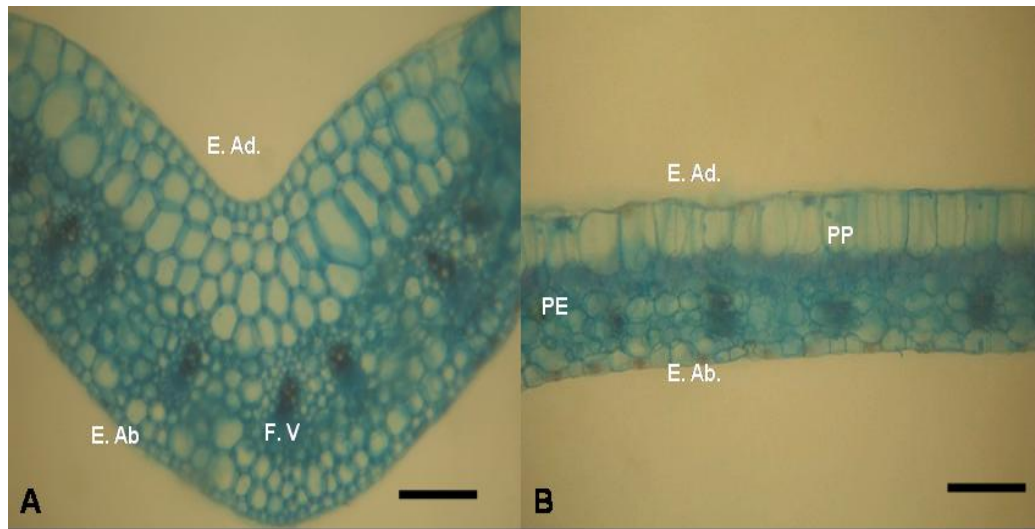


FIGURA 3. A. Secção transversal obtida de folhas *in vitro* de bastão-do-imperador 40x: EAd-epiderme adaxial; PP- parênquima paliçádico; PE-parênquima esponjoso; EAb- epiderme abaxial; PF- parênquima fundamental. UFLA, Lavras, MG, 2007. Barras 50 μ m.

Em secção transversal da lâmina foliar observaram-se variações na espessura da epiderme nas faces adaxial e abaxial (Tabela 1). Para os diferentes ambientes (*in vitro* e campo), a epiderme apresenta-se mais espessa nas condições de campo.

As médias de espessura foliar foram maiores em plantas também cultivadas em campo, quando comparadas com as plantas cultivadas *in vitro*,

acompanhando, assim, a espessura do parênquima paliçádico e esponjoso (Tabela 1).

TABELA 1. Espessura média (μm) de tecidos e espessura total do limbo foliar de plântulas de bastão-do-imperador, obtidas pela propagação *in vitro* e de plantas oriundas do campo.

Tratamento	E. abaxial	P. lacunoso	P. paliçádico	E. adaxial	F. vascular central	Esp. limbo
<i>In vitro</i>	16,73 b	134,13 b	95,52 a	22,36 b	87,06 b	268,74b
Campo	36,04 a	252,18 a	111,26 a	178,17a	328,46 a	577,65 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5%.

T1- folhas de plantas ao final da fase de enraizamento *in vitro*

E. abaxial: Epiderme abaxial

P. lacunoso: Perênquima lacunoso

E. adaxial: Epiderme adaxial

F. vascular central: Feixe vascular central

Esp. Limbo: Espessura do limbo

5.2 Plasticidade anatômica de folhas

Entre as três soluções nutritivas testadas, MS (Murashige & Skoog, 1962), HO (Hoagland & Arnon, 1950) e BJ (Bolle-Jones, 1954), houve diferenças significativas quanto à espessura dos tecidos avaliados (parênquima lacunoso e feixe fascular central), aos 30 dias de aclimatização (Figura 4).

Quanto às epidermes, a adaxial, desde o cultivo *in vitro*, apresenta-se como bisseriada e a abaxial como uniestratificada, revestidas pela cutícula, a qual verificou-se ser mais espessa nas plântulas já aclimatizadas, o que foi confirmado com cortes feitos em plantas a campo (Figura 4). O espessamento da cutícula é uma característica que confere às plantas cultivadas em ambiente natural uma proteção extra contra a ação da radiação solar, pelo reflexo dos raios solares, evitando um superaquecimento do citoplasma das células do mesófilo (Alquini et al., 2003).

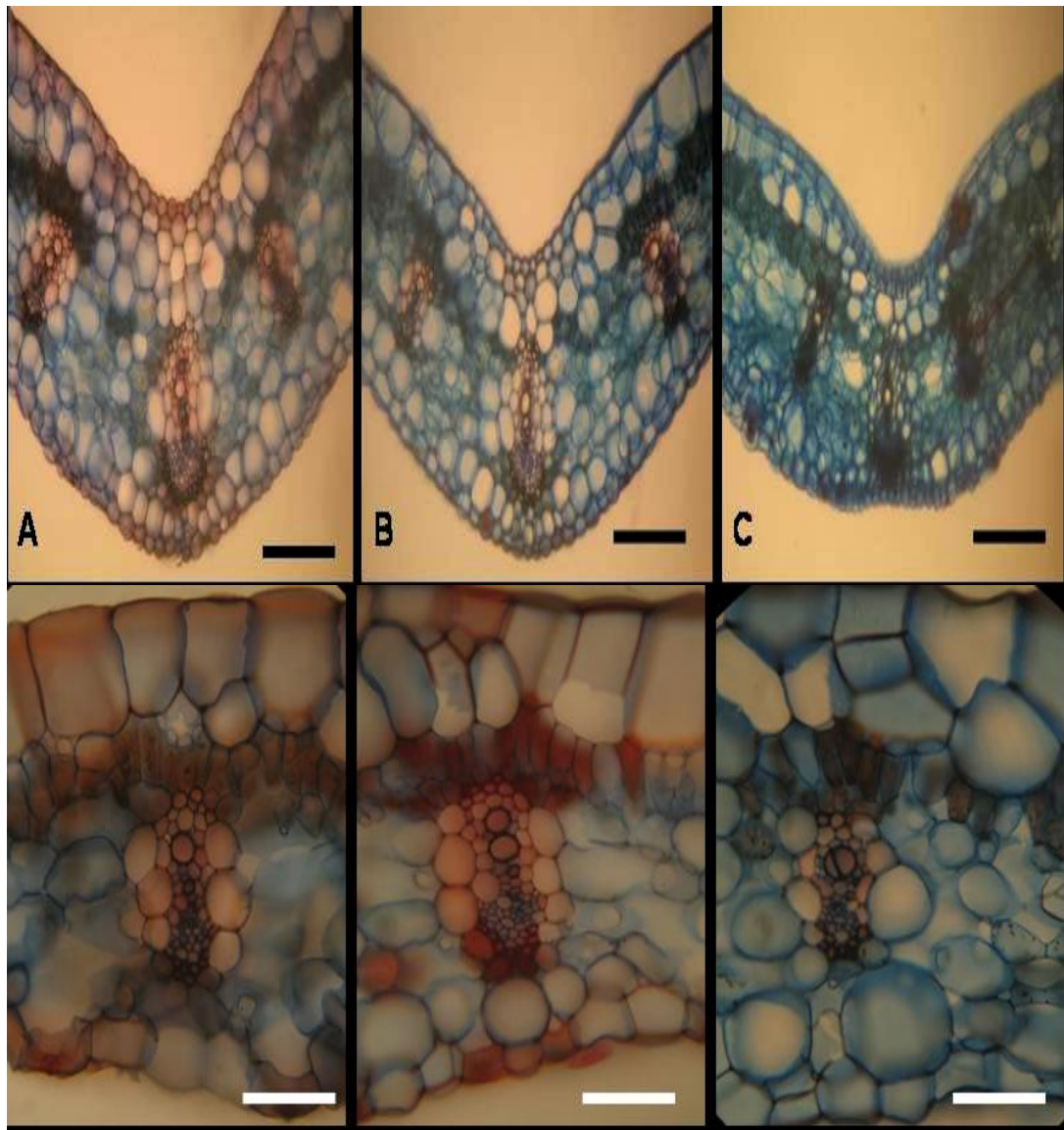


FIGURA 4. Secções transversais obtidas de plântulas com 30 dias de aclimatização. (A) Nervura central de folhas de plântulas irrigadas com solução nutritiva MS; (B) nervura central de folhas de plântulas irrigadas com solução nutritiva HO e (C) nervura central de folhas de plântulas irrigadas com solução nutritiva BJ. UFLA, Lavras, MG, 2007. Barras 50 μm .

Para o parênquima paliçádico não houve diferenças significativas quanto ao uso das três soluções nutritivas (Tabela 2).

TABELA 2. Espessura média (μm) de tecidos e espessura total do limbo foliar de *Étligera elatior* var. Red Torch, obtidas pela propagação *in vitro*, submetidas a três soluções nutritivas, nos primeiros 30 dias de aclimatização.

Tratamento	E. abaxial	P. lacunoso	P. paliçádico	E. adaxial	F. vascular central	Espessura limbo
MS (T2)	23,17 a	159,36 a	96,40 a	23,24 a	189,21 a	302,17 a
HO (T2)	24,08 a	136,57 b	94,5 a	23,75 a	153,27 b	278,9 b
BJ (T2)	20,89 a	131,44 b	93,81 a	21,68 a	120,71 c	264,82 b
CV%	11,25	15,87	17,92	13,57	9,99	18,25

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5%.

T2- folhas persistentes (formadas *in vitro*) de plantas com 30 dias de aclimatização

Aos 30 dias de aclimatização, pôde-se notar que a maior espessura do limbo de folhas de bastão-do-imperador foi observada em plantas cultivadas em solução nutritiva MS, seguidas das plantas cultivadas em HO e BJ (Tabela 2). A espessura do parênquima lacunoso foi a que mais contribuiu para a maior espessura do limbo nas plantas cultivadas na solução MS, uma vez que não foram observadas diferenças significativas na espessura das epidermes, nas três soluções nutritivas testadas (Tabela 2).

Tanto nas plântulas oriundas do cultivo *in vitro* quanto nas já submetidas à aclimatização, o mesofilo apresentou parênquima paliçádico constituído de duas camadas de células, porém, elas se apresentaram mais alongadas no ambiente *ex vitro*. Segundo Lee et al. (2000), células paliçádicas mais alongadas constituem um padrão clássico de resposta e de adaptação das plantas à alta intensidade luminosa, o que evidencia a plasticidade adaptativa de plantas bastão-do-imperador.

Aos 45 dias de aclimatização, as epidermes adaxial e abaxial desenvolvem-se muito rapidamente, quase que duplicando a espessura. Isso é um bom indicativo e mostra que a espécie se adapta perfeitamente ao novo ambiente de cultivo (Figura 5 e Tabela 3).

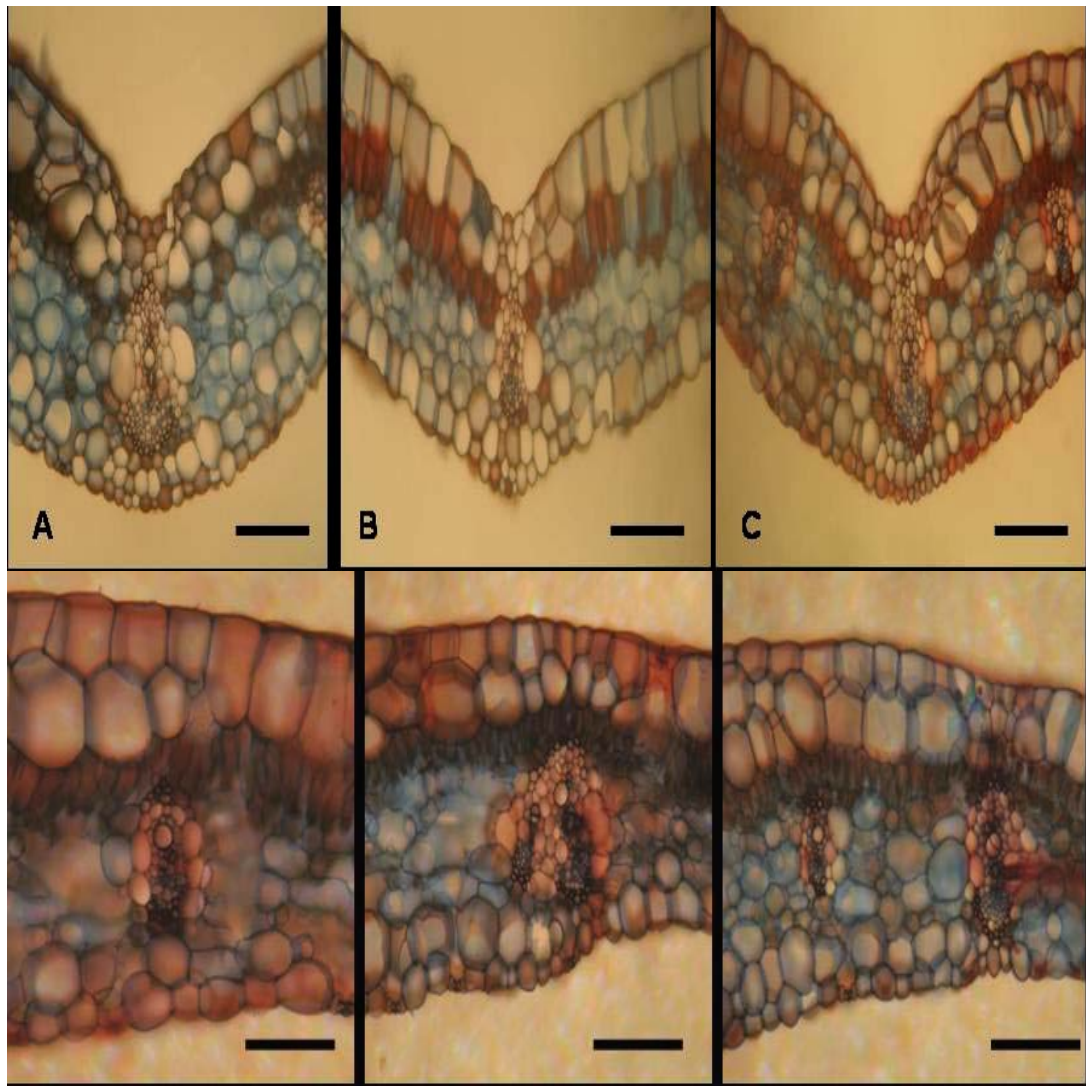


FIGURA 5. Secções transversais obtidas de plântulas aos 45 dias de aclimatização. (A) Nervura central de folha de plântulas irrigadas com solução nutritiva MS; (B) nervura central de folhas de plântulas irrigadas com solução nutritiva HO e (C) nervura central de folhas de plântulas irrigadas com solução nutritiva BJ. UFLA, Lavras, MG, 2007. Barras 50 μ m.

Porém, novamente, as epidermes não diferiram estatisticamente entre si, mostrando que as soluções são de excelente qualidade na aclimatização de plântulas de bastão-do-imperador. A diferença entre as soluções se deu pelo maior espessamento do parênquima lacunoso, incrementando, dessa maneira, um maior espessamento do limbo foliar das plântulas irrigadas com solução MS (Tabela 3). O parênquima paliçádico apresenta espessamento tecidual gradativo com o passar do tempo de aclimatização, mas não se diferencia estatisticamente, comparado com as três soluções nutritivas utilizadas (Tabela 3).

TABELA 3. Espessura média (μm) de tecidos e espessura total do limbo foliar de *Etiligera elatior* var. Red Torch, obtidas pela propagação *in vitro*, submetidas a três soluções nutritivas, nos primeiros 45 dias de aclimatização.

Tratamento	E. abaxial	P. lacunoso	P. paliçádico	E. adaxial	F. vascular central	Espessura limbo
MS (T3)	25,5 a	165,9 a	97,18 a	50,5 a	200,81 a	339,08 a
HO (T3)	25,66 a	139,25 b	95,2 a	46,23 a	178,9 b	306,34 b
BJ (T3)	22,89 a	134,31 b	94,82 a	45,01 a	149,51 c	296,89 b
CV%	15,32	11,86	14,22	20,87	17,53	10,87

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5%.

T3- novas folhas formadas *ex vitro* de plantas com 45 dias de aclimatização (folhas de transição).

Esse resultado corresponde, em parte, ao reportado por Gonçalves et al. (2000) em plantas micropropagadas de castanha (*Castanea sativa* x *C. crenata*), em que um progressivo incremento na percentagem de parênquima paliçádico foi obtido com a aclimatização. Contudo, as folhas formadas *ex vitro* tiveram, progressivamente, células paliçádicas organizadas, uniformes e de formato mais retangular, sendo a diferenciação entre os parênquimas mais notável na segunda e terceira folhas formadas durante a aclimatização.

Aos 60 dias de aclimatização, a organização dos tecidos está de acordo com os observados nas plantas em campo. A solução nutritiva MS foi eficiente em proporcionar uma aclimatização, a qual corrigisse pequenas anomalias ocasionadas pelo cultivo *in vitro* (Figura 6).

Quanto à formação e o desenvolvimento do feixe vascular central, a solução nutritiva MS é a que mais contribui para uma melhor funcionalidade, em todas as épocas de avaliação (Figura 6).

Maior espessura do limbo de folhas de bastão-do-imperador foi observada em plântulas irrigadas com solução nutritiva MS, seguida das plântulas cultivadas em HO e BJ (Tabela 4).

A espessura do parênquima lacunoso foi o fator que mais contribuiu para a maior espessura do limbo foliar das plântulas cultivadas em solução nutritiva MS, uma vez que não foram observadas diferenças significativas na espessura do parênquima paliádico e nas epidermes (Tabela 4).

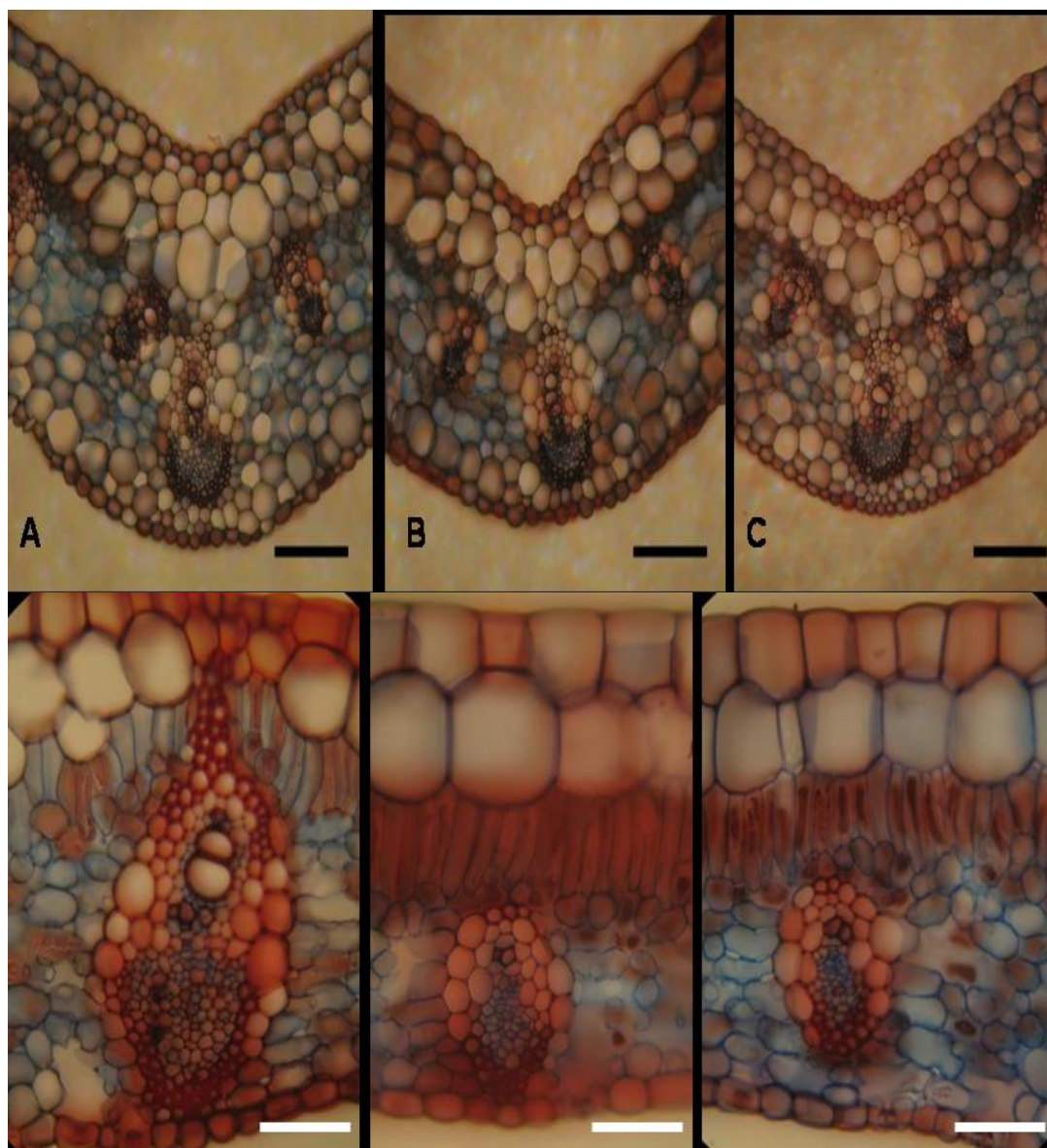


FIGURA 6. Secções transversais obtidas de plântulas aos 60 dias de aclimatização. (A) Nervura central de folhas de plântulas irrigadas com solução nutritiva MS; (B) Nervura central de folhas de plântulas irrigadas com solução nutritiva HO e (C) nervura central de folhas de plântulas irrigadas com solução nutritiva BJ. UFLA, Lavras, MG, 2007. Barras 50 μ m.

Os resultados aqui observados mostram que algumas características anatômicas verificadas em folhas formadas *in vitro* ainda persistem nas primeiras folhas desenvolvidas *ex vitro* e que somente folhas oriundas de primórdios foliares diferenciados *ex vitro* possuem anatomia mais semelhante às plantas adultas (em campo). Esses achados concordam com afirmações de outros autores, como Gonçalves et al. (2000) e Romano & Martins-Loução (2003). Os mesmos autores ainda argumentam que o grau de transição e diferenciação em relação à anatomia foliar durante a fase de adaptação *ex vitro* das plantas micropropagadas está associado à quantidade e estágio de maturidade dos primórdios foliares remanescentes do cultivo *in vitro* no momento da transferência das plantas, bem como também às condições de estresses nas quais as plantas são submetidas.

TABELA 4. Espessura média (μm) de tecidos e espessura total do limbo foliar de *Etiligera elatior* var. Red Torch obtida pela propagação *in vitro*, submetida a três soluções nutritivas, nos primeiros 60 dias de aclimatização.

Tratamento	E. abaxial	P. lacunoso	P. paliçádico	E. adaxial	F. vascular central	Espessura limbo
MS (T4)	29,1 a	193,98 a	100,97 a	59,8 a	214,71 a	383,85 a
HO (T4)	27,19 a	154,32 b	99,81 a	53,59 a	191,7 b	334,91 b
BJ (T4)	25,81 a	141,2 b	97,42 a	50,1 a	169,1 c	314,53 b
CV%	17,85	22,58	12,20	13,92	12,87	19,65

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5%.

T4- novas folhas de plantas com 60 dias de aclimatização

5.3 Densidade estomática

A presença de estômatos durante a aclimatização utilizando três diferentes soluções nutritivas em campo somente foi verificada na epiderme abaxial das lâminas foliares, o que caracteriza o bastão-do-imperador como uma espécie hipoestomática.

Houve diferenças estatísticas para a densidade estomática durante os períodos de aclimatização (Tabela 5). Maior densidade estomática foi observada nas plântulas sob condições *in vitro* (250 estômatos por mm^2), comparadas às já aclimatizadas (60 dias e campo), com 175 (uma média das 3 soluções) e 190 estômatos por mm^2 . O aumento no número de estômatos/ mm^2 nas folhas das plantas cultivadas *in vitro*, comparado às plantas da mesma espécie que crescem em outros ambientes, tem sido reportado em diversos estudos associados, principalmente, à elevada umidade relativa do ar no interior do recipiente.

Soares (2005), estudando a aclimatização de plantas de mangabeira, observou que plantas *in vitro* tinham maiores densidades estomáticas, comparadas às plantas já aclimatizadas.

Castro et al. (2007), verificando alterações de folhas de *Mikania gomerata* Sprengel (*Asteraceae*), verificaram que, em condições de pleno sol (a campo), essas folhas apresentavam, em média, 170 estômatos/ mm^2 e, quando eram submetidas a sombreamento de 30%, a quantidade de estômato por mm^2 subiu para 217.

Quantidades, distribuição, tamanho, forma e mobilidade dos estômatos são características específicas de cada espécie e podem se alterar em função das adaptações às condições ambientais (Larcher, 2000). Além do comportamento estomático, o número e o tamanho das células da epiderme podem variar de maneira significativa entre plantas cultivadas em diferentes ambientes (Abrams & Mostoller, 1995). Essas adaptações das células comuns e especializadas da epiderme são fundamentais para o processo de adaptação das plantas a diferentes

condições ambientais, otimizando, principalmente, o processo de trocas gasosas entre a perda de água para transpiração e absorção de CO₂, necessários à fotossíntese.

Segundo Goryshima (1989), a densidade estomática aumenta à medida que a intensidade de radiação diminui, concordando, portanto, com os resultados obtidos neste trabalho. As modificações da epiderme são distintas em diferentes espécies quanto às mudanças nos níveis de radiação. Em *Ocimum selloi* BenTh, a frequência e o número de estômatos na epiderme foliar adaxial e abaxial foram significativamente diferentes nas plantas crescidas em campo (radiação solar plena) e nas crescidas sob sombreamento de 50% (Gonçalves, 2001).

TABELA 5. Média do número (N^o) de estômatos/mm², diâmetro (D) polar e diâmetro equatorial dos estômatos da face abaxial em indivíduos de *Etiligera elatior* var. Red Torch, obtida pela propagação *in vitro* e submetida a períodos de aclimatização com três diferentes soluções nutritivas e plantas em campo. UFLA, Lavras, MG, 2007.

	<i>In vitro</i>	Campo	MS ¹	HO ¹	BJ ¹	MS ²	HO ²	BJ ²	MS ³	HO ³	BJ ³
N ^o estômatos (mm ²)	250 a	190b	220a	233a	230a	200b	210b	215a	198b	200b	200b
D. polar (µm)	60,28 b	83,03 a	78,45 a	77,61a	77,77 a	79,02 a	77,19 a	77,26a	77,24a	79,12a	79,4a
D. equatorial (µm)	40,09 b	45,11a	42,66a	44,29a	45,22 a	45,65 a	45 a	44,74 a	45,3 a	45,7 a	45,22 a
P/E	1,50 c	1,84 a	1,83 a	1,75 b	1,71 b	1,73 b	1,71 b	1,72 b	1,70 b	1,73 b	1,75 b

1- 30 dias de aclimatização; **2-** 45 dias de aclimatização; **3-**60 dias de aclimatização

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5%

Para diâmetro polar dos estômatos, houve diferenças significativas com relação ao ambiente, o qual apresentou maiores diâmetros nas folhas das plantas em campo (Tabela 4).

Os estômatos das folhas de plântulas *in vitro* apresentaram diâmetro polar de 60,28 μm e o equatorial de 40,09 μm . Nas folhas aclimatizadas ou de campo, o diâmetro polar médio dos estômatos foi de 71 μm e 83 μm e o equatorial de 42 μm e 45 μm (Tabela 4).

Verificou-se também que os estômatos das folhas de plântulas mantidas *in vitro* apresentaram formato circular, indicando sua menor funcionalidade em relação aos de formato elíptico, encontrados nas plântulas aclimatizadas ou em campo (Figura 7). Diversos estudos mencionam que a estrutura dos estômatos das plantas micropropagadas apresenta grandes diferenças em relação à observada nas plantas que se desenvolvem em ambiente natural (Fráguas, 2003).

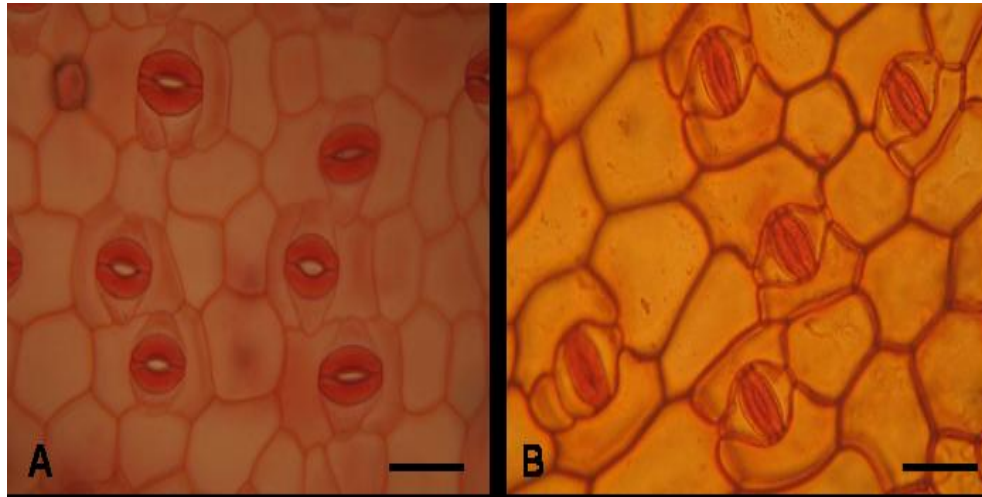


FIGURA 7. (A) Epiderme abaxial de folhas de bastão-do-imperador *in vitro* e (B) em campo. UFLA, Lavras, MG, 2007. Barras 100 μm .

Além dos estômatos, diferenças no formato das células epidérmicas também foram verificadas. As células da epiderme das plântulas mantidas *in vitro* apresentam-se mais sinuosas e dotadas de parede menos espessas, o que pode estar relacionado com o fato de essas plântulas não apresentarem, ainda, características adaptativas contra a perda excessiva de água (Figura 8).

De acordo com Capellades et al. (1990), o período de aclimatização *ex vitro* permite redução na frequência do número de estômatos, altera o formato e a topografia desses e, de maneira geral, favorece os diversos parâmetros foliares.

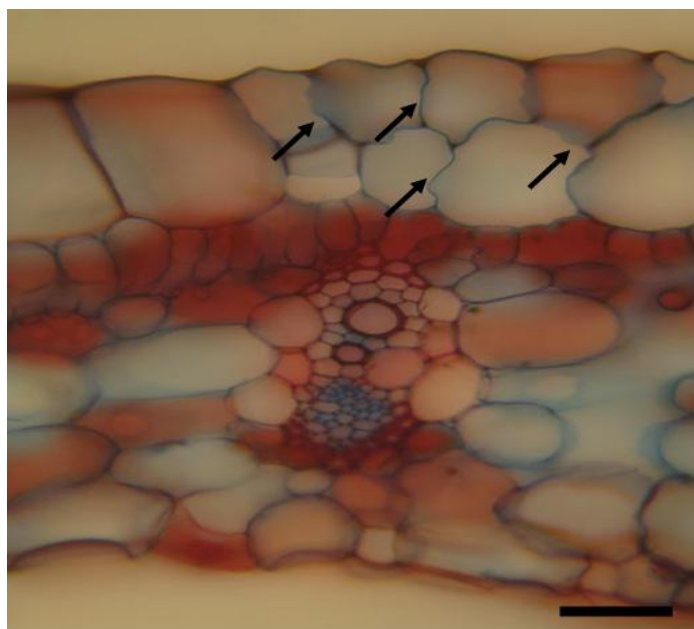


FIGURA 8. Secção transversal do limbo foliar de bastão-do-imperador com 30 dias de aclimatização apresentando sinuosidades nas células da epiderme adaxial (setas). UFLA, Lavras, MG, 2007. Barras 100 μ m.

6 CONCLUSÕES

Em plântulas de bastão-do-imperador já aclimatizadas, verifica-se também a presença de uma epiderme bisseriada (adaxial) e outra unisseriada (abaxial), dotada de espessa camada cuticular. O mesofilo apresenta organização dorsiventral, com parênquima paliçádico constituído de um ou duas camadas de células bastante alongadas. Estômatos estão presentes, em grande quantidade somente na epiderme abaxial, constituída de células com espessa parede.

A melhor solução nutritiva testada foi MS, a qual foi eficiente em aclimatizar plântulas de bastão-do-imperador, corrigindo anomalias provocadas pelo cultivo *in vitro*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, M. D.; MOSTOLLER, S. A. Gas exchange, leaf structure and nitrogen in contrasting successional tree species growing in open and understores sites during a drought. **Tree Physiology**, v. 15, n. 6, p. 361-370, 1995.

ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOEGER, M. R. T.; COSTA, C. G. da; BARROAS, C. F. Epiderme. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREI, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2003. p. 87-108.

BELLÉ, S.; KÄMPF, A. N. Produção de mudas de maracujá amarelo em substratos à base de turfa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 385-390, 1993.

BOLLE-JONES, E. W. Cooper its effects on the growth of rubber plant (*Hevea brasiliensis*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 10, n. 2, p. 150-178, 1954.

BOSA, N.; CALVETE, E. O.; NIENOW, A. A.; SUZIN, M. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 207-210, abr./jun. 2003.

BRAINED, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 515-518, 1981.

CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; DAUDT, R. Efeito do substrato na aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv Campinas, *Fragaria x ananassa* Duch. In: KÄMPF, A. N.; FERMINO, M. H. (Ed.). **Substrato para plantas** – a base da produção vegetal em recipientes. Porto Alegre: Genesis, 2000. p. 257-264.

CAPELLADES, R.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue cultured *Rosa multiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 1, p. 141-145, Jan. 1990.

CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; SOARES, A. M. MELO, H. C.; BERTALUCCI, S. K. V.; L. JÚNIOR, E. C. Adaptações anatômicas de folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (*Asteraceae*), em três regiões distintas da planta,

em diferentes níveis de sombreamento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 2, p. 8-16, 2007.

COUTINHO, M.; CARVALHO, E. J. M. Caracterização das propriedades de alguns substratos para a propagação de mudas. **Bragantia**, Campinas, v. 14, p. 167-176, 1983.

DEBERGH, P. C. Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. **Acta Horticulturae**, v. 289, p. 291-300, 1991.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4. 3**: sistema de análise estatística. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.

FRÁGUAS, C. B.; PEREIRA, A. R.; PASQUAL, M. **Aclimatização de Plântulas de *Ficus carica* cv. Roxo-de-Valinhos Micropropagadas**.

Disponível em:

<http://www.ufpel.edu.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/propagacao/928.htm>. Acesso em: 27 maio 2007.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: in practice**. 2.ed. Edington: Exegetics, 1996. Pt.2, 1361 p.

GONÇALVES, J. C.; DIOGO, G.; COELHO, M. T.; AMÂNCIO, S. Changes in leaf morphology and anatomy of *in vitro*-cultured chestnut plantlets during acclimatisation. **Acta Horticultural**, v. 520, p. 183-193, 2000. (Proceedings of International Horticultural Congress, 25).

GONÇALVES, L. A. **Ontogenia dos tricomas glandulares e influência da radiação solar no desenvolvimento e teor de óleo essencial do *Ocimum sollo* Benth (Lamiaceae)**. 2001. 95p. Dissertação (Mestrado em Botânica)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

GROYSHINA, T. K. **Fotosinteticheskii aparta rastenni I uslovija sredy**. Izd. Leningrad: Leningrad University, 1989.

HANBA, Y. T.; KOGAMI, H.; TERASHIMA, L. The effects of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. **Plant Cell and Environment**, v. 25, n. 8, p. 1021-1030, 2002.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950.

JOHANSEN, B. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. p. 523.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 513 p.

LEE, D. W.; OBERBAUER, S. F.; JOHNSON, P.; KRISHNAPILAY, B.; MANSOR, M. MOHAMAD.; YAP, S. K. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure functions in seedlings of two Southeast Asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 87, n. 4, p. 447-455, 2000.

MACIEL, A. L. R.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Aclimatização de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) obtidas *in vitro*: efeitos do substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 9-12, jan./mar. 2000.

MENEZES, N. L.; SILVA, D. C.; PINNA, G. F. M. Folha. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREI, S. M. (Ed). **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2003. p. 438.

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

NEVES, M. B.; WATANABE, A. A.; MARQUES, R. R.; FONSECA, N. R.; RIGOLON, C. M.; BOARO, C. S. F. Análise de crescimento de girassol ornamental em cultivo hidropônico, com variação de níveis de nutrientes. **Brasilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 414, 2005. Supplement.

ROMANO A.; MARTINS-LOUÇÃO M. A. A perda de água e as modificações morfológicas nas folhas durante o acclimatization do carvalho de cortiça micropropagated plantlets. **Acta Horticulturae**, n. 616, p. 439-442, 2003.

SANTOS, I. C. F.; OLIVEIRA, L. E. M. de; CARVALHO, J. G. de; MESQUITA, A. C. Aspectos sintomáticos da toxidez de cádmio, níquel e zinco, em diferentes concentrações, para plantas de seringueira [*hevea brasiliensis* (wild. ex. adr. de juss.) muell. arg.] cultivadas em solução nutritiva. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 415, 2005. Supplement.

SCHLUTER, U.; MUSCHAK, M.; BERGER, D.; ALTMANN, T. Photosynthetic performance of an Arabidopsis mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 867–874, 2003.

SILVA, A. B. da.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. de R.; DUTRA L. F. Bap e substratos na aclimatização de plântulas de gloxínia (*Sinningia speciosa* lood. hiern.) provenientes de cultura de tecidos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 255-260, mar./abr. 2003.

SOARES, F. P. **Aspecto do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes)**. 2005. 137 p. Dissertação. (Mestrado Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

T. NETO, C. P. C.; HERNANDEZ, F. F. F.; BEZERRA, F. C.; SOUSA, R. F. de; CAVALCANT, M. L. F. Efeito da concentração salina da solução nutritiva na aclimação de plantas micropropagadas de Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2, 2004.