


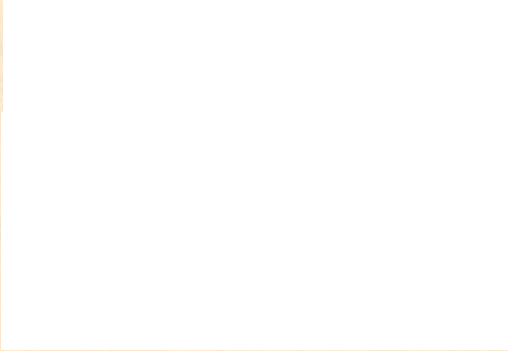
37000

AURORA YOSHIKO SATO

**PROPAGAÇÃO DE GÉRBERA DE VASO ATRAVÉS DA CULTURA DE
TECIDOS**



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



Orientador

Prof. JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO



**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1994**

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

Sato, Aurora Yoshiko.

Propagação de gérbera de vaso através da cultura
de tecidos / Aurora Yoshiko Sato. -- Lavras : ESAL,
1994.

95p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado) -- Escola Superior de Agri-
cultura de Lavras.

Bibliografia.

1. Gérbera - Cultura de tecidos. 2. Gérbera -
Propagação. I. Escola Superior de Agricultura de La-
vras. II. Título.

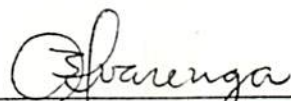
CDD-583.55
-635.93355

AURORA YOSHIKO SATO

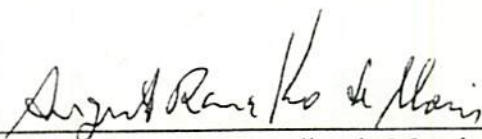
**PROPAGAÇÃO DE GÉRBERA DE VASO ATRAVÉS DA CULTURA DE
TECIDOS**

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

APROVADA em 16 de dezembro de 1994.



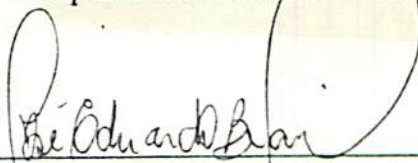
Prof. Dr. Amauri alves de Alvarenga



Prof. Dr. Augusto Ramalho de Moraes



Pesq. Eduardo Fonseca Arelló



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

Aos meus pais Katsuhei e Ruriko
ao meu filho João Carlos Yuyi
e, com carinho à meu marido Herly

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

À Deus que nos dá coragem de seguir em frente.

À Escola Superior de Agricultura de Lavras, em especial aos professores e funcionários dos Departamentos de Fitotecnia, Biologia e Microbiologia do Solo.

Ao Professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pela orientação dedicada, amizade certa e um exemplo de ser humano.

Ao Professor José Oswaldo Siqueira pelos aconselhamentos e sugestões seguras.

Aos Professores Amauri Alves de Alvarenga, Augusto Ramalho de Moraes e ao Eng. Agrônomo MS Eduardo Arello pelo grande auxílio em dignificar este trabalho.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Pesquisa - pelo auxílio financeiro.

À APG - Associação de Pós-Graduação que facilitou o viver do pós-graduando.

Aos funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos, Evaldo de Souza Arantes e Vantuil Antônio Rodrigues; do Laboratório de Microbiologia do Solo Manoel Aparecido da Silva, pela paciência em ensinar e ajudar.

Aos amigos Renato e Dulcimara pela prestatividade nos momentos de dificuldade e pela amizade.

À Denise pela análise estatística.

Ao Arie e Fátima pelo trabalho datilográfico.

Aos amigos do LCT - Beni, Patricia, Marli, Sérgio, Clóvis, Osmar, Magno, Márcia, Poliana e Ilka, enfim a todos que permitiram momentos agradáveis de trabalho e amizade.

Aos meus sogros Alceu e Aparecida pela presença constante em todos os momentos marcantes de nossa vida.

Aos meus cunhados, cunhadas e sobrinhos pela amizade e força.

Ao meu irmão pela amizade franca e eterna.

À minha tia Fusako pelo apoio e estima.

Às minhas amigas-irmãs: Helô, Helene, Sandra, Vera, Déborah, Isa, Cidinha, Marina, Rita, Ana Rita, Naka e prima Taeko pela amizade e cumplicidade da alma feminina.

Ao casal Marcelo e Adriana e a filha Moara que estiveram sempre presentes na alegria e na tristeza.

E mais uma vez agradeço a Deus por me agraciar neste período com este trabalho concluído, com um marido maravilhoso e um filho precioso.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE APÊNDICE	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvi
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
2 EFEITO DA RELAÇÃO $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ COM E SEM BAP NA MULTIPLICAÇÃO DE GÉRBERA DE VASO À PARTIR DE GEMAS	4
RESUMO	4
2.1 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	10
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
2.3.1 Pesos de matérias fresca e seca da parte aérea	12
2.3.2 Pesos de matérias fresca e seca da raiz	16
2.3.3 Comprimento da parte aérea	20
2.3.4 Número de brotos	21
2.3.5 Número de folhas	25
2.4 CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
3 AVALIAÇÃO DE UM NOVO REGULADOR DE CRESCIMENTO E CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO NA MULTIPLICAÇÃO DE GÉRBERA DE VASO	32
RESUMO	32
3.1 REFERENCIAL TEÓRICO	32
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.2.1 Avaliação do TDZ entre 0 e 4 mg/L	35

	Página
3.2.2 Avaliação do TDZ entre 0 e 0,5 mg/L	36
3.2.3 Avaliação do efeito do nitrogênio com TDZ	36
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.3.1 Avaliação do TDZ entre 0 e 4 mg/L	37
3.3.1.1 Pesos de matérias fresca e seca da parte aérea do Clone II	37
3.3.1.2 Número de brotações de Clone II	38
3.3.1.3 Número de folhas do Clone II	39
3.3.1.4 Comprimento da parte aérea do Clone II	40
3.3.2 Avaliação de TDZ entre 0 e 0,5 mg/L	41
3.3.3 Efeito do nitrogênio com TDZ na multiplicação	44
3.3.3.1 Pesos de matérias fresca e seca do Clone 800X	44
3.3.3.2 Número de brotações do Clone 800X	45
3.3.3.3 Número de folhas do Clone 800X	46
3.3.3.4 Comprimento da parte aérea do Clone 800X	46
3.4 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
4 EFEITO DO FILTRO AMARELO NO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE GÉRBERA DE VASO <i>IN VITRO</i>	50
RESUMO	50
4.1 REFERENCIAL TEÓRICO	50
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.4 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
5 EFEITO DE DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO NO ENRAIZAMENTO DE GÉRBERA DE VASO <i>IN VITRO</i>	59
RESUMO	59
5.1 REFERENCIAL TEÓRICO	60
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	62
5.2.1 Efeito de concentrações de AIA	62
5.2.2 Efeito de concentrações de ANA e IBA	62
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.4 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
6 INFLUÊNCIA DA MICORRIZA NA FASE DE ACLIMATAÇÃO DE PLÂNTULAS DE GÉRBERA DE VASO MICROPROPAGADAS	70
RESUMO	70
6.1 REFERENCIAL TEÓRICO	71
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	73
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
6.4 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
APÊNDICE	88

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Concentração (mM) de NH_4NO_3 , NO_3^- , NH_4^+ , N total e relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, com ou sem 2 mg/L de BAP, para gérbera de vaso Clones II, III e 800X. ESAL, Lavras - MG, 1994	11
2	Valores médios dos pesos e matérias fresca e matéria seca da parte aérea de gérbera de vaso Clones II, III e 800X na relação com BAP/sem BAP em função da ausência e presença de BAP (2 mg/L). ESAL, Lavras - MG, 1994 ..	12
3	Valores médios de comprimento e número de folhas, com e sem BAP, em função das dosagens de nitrogênio, para os Clones II, III e 800X de gérbera de vaso. ESAL, Lavras - MG, 1994	20
4	Valores médios dos pesos das matérias fresca e seca, comprimento da parte aérea, número de brotações e folhas de gérbera de vaso em função das concentrações de TDZ, para os Clones III e 800X. ESAL, Lavras - MG, 1994	43
5	Valores médios dos pesos de matérias fresca e seca, número de brotações e folhas e comprimento de gérbera de vaso Clone 800X em função das concentrações de nitrato de amônio com 0,05 mg/L de TDZ. ESAL, Lavras - MG, 1994	45
6	Valores médios dos pesos das matérias fresca e seca de gérbera de vaso, Clones II e 800X, em função da presença e ausência do filtro amarelo. ESAL, Lavras - MG, 1994	53
7	Análise química foliar da gérbera de vaso Clone 800X com e sem filtro. ESAL, Lavras - MG, 1994	57
8	Valores médios do comprimento da parte aérea e raiz, número de raízes/plântula e número de folhas da gérbera de vaso Clone 800X em função das concentrações do AIA. ESAL, Lavras - MG, 1994	63

Tabela	Página	
9	Efeito dos fungos MVA (<i>Gigaspora margarita</i> , <i>Glomus etunicatum</i> e <i>Glomus clarum</i>) no número de raízes/planta, comprimento da raiz, porcentagem de colonização e área foliar específica de gérbera Clone II aos 30 e 60 dias. ESAL, Lavras - MG, 1994 78	78
10	Comparação da análise de nutrientes foliares após 30 dias nas plântulas de gérbera de vaso Clone II inoculados com fungos <i>Glomus clarum</i> , <i>G. etunicatum</i> , <i>Gigaspora margarita</i> e a testemunha. ESAL, Lavras - MG, 1994 79	79
11	Valores médios de pesos de matérias fresca e seca da parte aérea e da raiz, comprimento da parte aérea e da raiz, número de folhas e de raízes e porcentagem de colonização de gérbera de vaso Clone 800X em função dos fungos MVA (<i>Gigaspora margarita</i> , <i>Glomus clarum</i> , <i>Glomus etunicatum</i> e inóculo múltiplo - mistura dos três). ESAL, Lavras - MG, 1994 81	81
12	Teores médios dos minerais obtidos na análise química foliar da gérbera de vaso Clone 800X, após 60 dias da inoculação em função dos fungos MVA (testemunha, <i>Gigaspora margarita</i> , <i>Glomus clarum</i> , <i>Glomus etunicatum</i> , e inóculo múltiplo). ESAL, Lavras - MG, 1994 82	82
13	Relação Peso de Matéria seca da parte aérea/peso de matéria seca de raízes de gérbera de vaso Clone 800X submetidos aos tratamentos com fungos MVA (<i>Gigaspora margarita</i> , <i>Glomus clarum</i> , <i>Glomus etunicatum</i> , e inóculo múltiplo). ESAL, Lavras - MG, 1994 84	84

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representação gráfica do efeito das concentrações de N na forma de NH_4NO_3 sobre os pesos das matérias fresca e seca da parte aérea de gérbera de vaso Clone II. ESAL, Lavras - MG, 1994	13
2	Representação gráfica do efeito das concentrações de N na forma de NH_4NO_3 com e sem BAP (2 mg/L) sobre o peso das matérias fresca e seca da parte aérea de gérbera de vaso Clone III. ESAL, Lavras - MG, 1994	15
3	Representação gráfica do efeito das concentrações de N na forma de NH_4NO_3 sobre os pesos das matérias fresca e seca da parte aérea de gérbera de vaso Clone 800X. ESAL, Lavras, MG, 1994	15
4	Representação gráfica dos pesos das matérias fresca e seca das raízes gérbera de vaso Clone II em função da ausência e presença de BAP. ESAL, Lavras - MG, 1994	17
5	Fotografias ilustrativas dos experimentos de nitrato de amônio com e sem BAP de gérbera de vaso Clones II, III e 800X. ESAL, Lavras - MG, 1994	18
6	Representação gráfica do efeito das concentrações de N na forma de NH_4NO_3 nos pesos das matérias fresca e seca das raízes de gérbera de vaso Clone II. ESAL, Lavras - MG, 1994	19
7	Representação gráfica do efeito das concentrações de N na forma de NH_4NO_3 , com e sem BAP, sobre o número de brotações de gérbera de vaso Clone II. ESAL, Lavras - MG, 1994	22
8	Representação gráfica do efeito das concentrações de N na forma de NH_4NO_3 , com e sem BAP, sobre o número de brotações de gérbera de vaso Clone III. ESAL, Lavras - MG, 1994	22
9	Representação gráfica do efeito das concentrações de N na forma de NH_4NO_3 , com e sem BAP, sobre o número de brotações de gérbera de vaso Clone 800X. ESAL, Lavras - MG, 1994	23
10	Estruturas químicas de (A) Thidiazuron, (B) cinetina, (C) BA, (D) zeatina e (E) 2.i.P. ESAL, Lavras - MG, 1994	33

Figura		Página
11	Representação gráfica do efeito do TDZ sobre os pesos de matérias fresca e seca de gérbera de vaso Clone II. ESAL, Lavras - MG, 1994	37
12	Representação gráfica do efeito do TDZ sobre o número de brotações e número de folhas de gérbera de vaso Clone II. ESAL, Lavras - MG, 1994	39
13	Representação gráfica do comprimento da parte aérea de gérbera de vaso Clone II em função das concentrações de TDZ. ESAL, Lavras - MG, 1994	40
14	Fotografia ilustrativa do experimento com TDZ em gérbera de vaso Clone 800X. ESAL. Lavras - MG, 1994	42
15	Representação gráfica do efeito do filtro amarelo no comprimento de gérbera de vaso Clone II. ESAL, Lavras - MG, 1994	54
16	Representação gráfica do efeito do filtro amarelo na porcentagem de vitrificação de gérbera de vaso Clone II e III. ESAL, Lavras - MG, 1994	55
17	Fotografia ilustrativa do efeito do filtro amarelo no comprimento de gérbera de vaso Clone II. ESAL, Lavras - MG, 1994	56
18	Representação gráfica do efeito do IBA e ANA no comprimento de raízes de gérbera de vaso Clone II, ESAL, Lavras - MG, 1994	65
19	Representação gráfica do efeito do IBA e ANA na porcentagem de vitrificação de gérbera de vaso Clone II. ESAL. Lavras - MG, 1994	66
20	Representação gráfica do efeito dos fungos MVA (<i>Gigaspora margarita</i> , <i>Glomus etunicatum</i> e <i>Glomus clarum</i>) na matéria fresca da parte aérea de gérbera de vaso Clone II aos 30 e 60 dias. ESAL, Lavras - MG, 1994	75
21	Representação gráfica do efeito dos fungos MVA (<i>Gigaspora margarita</i> , <i>Glomus etunicatum</i> , <i>Glomus clarum</i>) na matéria seca da parte aérea de gérbera de vaso Clone II aos 30 e 60 dias. ESAL, Lavras - MG, 1994	76
22	Representação gráfica do efeito dos fungos MVA (<i>Gigaspora margarita</i> , <i>Glomus etunicatum</i> , e <i>Glomus clarum</i>), no número de folhas de gérbera de vaso Clone II aos 30 e 60 dias. ESAL. Lavras - MG, 1994	77
23	Representação gráfica do efeito dos fungos MVA (<i>Gigaspora margarita</i> , <i>Glomus etunicatum</i> , e <i>Glomus clarum</i>) nos pesos de matérias fresca e seca das raízes de gérbera de vaso Clone II aos 30 e 60 dias. ESAL, Lavras - MG, 1994	78
24	Fotografia ilustrativa do efeito da micorriza na gérbera de vaso Clone 800X. A - testemunha, B - <i>Gigaspora margarita</i> , C - <i>Glomus clarum</i> , D - <i>Glomus etunicatum</i> , E - inóculo múltiplo. ESAL, Lavras - MG, 1994	81

LISTA DE APÊNDICE

Tabela		Página
1A	Resumo do quadro de análise de variância para peso das matérias fresca e seca da parte aérea $\log(x+10)$, peso das matérias fresca e seca de raiz $(x+5)$, número de brotos e folhas $(x+5)$, comprimento da parte aérea $\log(x+10)$ e número de raízes $(x+5)$ do Clone II	89
2A	Resumo do quadro de análise de variância para peso da matéria fresca e seca da parte aérea comprimento da parte aérea, e número de folhas do Clone III, dados não transformados	89
3A	Resumo do quadro de análise de variância para peso da matéria fresca e seca da parte aérea, comprimento da parte aérea e número de folhas do Clone 800X, dados não transformados	90
4A	Resumo do quadro de análise de variância do peso esco e seco da parte aérea, número de brotos e de folhas e comprimento da parte aérea para o Clone II, dados não transformados	90
5A	Resumo do quadro de análise de variância do peso das matérias fresca e seca da parte aérea, número de brotos e de folhas e comprimento da parte aérea para o Clone 800X, dados não transformados	91
6A	Resumo do quadro de análise de variância do peso da matériaS fresca e seca, e comprimento da Parte Aérea $(x+5)$ do Clone II	91
7A	Resumo do quadro de análise de variância do peso da matéria fresca e comprimento da parte aérea $(x+5)$ do Clone III	92
8A	Resumo do quadro de análise de variância do peso da matéria fresca da parte aérea $(x+5)$ do Clone 800X	92
9A	Resumo do quadro de análise de variância de número de plantas enraizadas, vitrificadas, número de raízes/planta, comprimento de raíz $(x+5)$	93
10A	Resumo do quadro de análise de variância do número de folhas, raízes, raízes fasciculadas, comprimento da parte aérea e raiz $(x+5)$	93

Tabela	Página
11A Resumo do quadro de análise de variância do peso da matéria fresca e seca da parte aérea e raiz, comprimento da parte aérea e raiz, nº de folhas e raízes (x+5) do Clone 800X	94
12A Resumo do quadro de análise de variância de peso de matérias fresca e seca da parte aérea, peso de matéria fresca da raiz, número de folhas, raízes, comprimento da raiz, área foliar específica e porcentagem de colonização do Clone II aos 30 dias	94
13A Resumo do quadro de análise de variância de peso da matéria fresca e seca das folhas e do pecíolo, peso de matéria fresca da raiz, número de folhas, raízes, comprimento da raiz e porcentagem de colonização do Clone II aos 60 dias	95
14A Resumo do quadro de análise de variância de peso de matéria fresca e seca da parte aérea e raiz e número de folhas do Clone II aos 90 dias	95

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA = ácido indolacético

ANA = ácido naftalenoacético

BAP, BA = benzyl aminopurina

GA₃, GA = ácido giberélico

IBA = ácido indolbutírico

TDZ = Thidiazuron

MVA = micorriza vesículo - arbuscular

RESUMO

SATO, Aurora Yoshiko. **Propagação de gérbera de vaso através da cultura de tecidos.** Lavras: ESAL, 1994. 95p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

O presente trabalho teve como objetivo aperfeiçoar técnicas de micropropagação e aclimatação de gérbera de vaso.

Os ensaios foram realizados *in vitro* e em condições de casa de vegetação subdivididos nas seguintes fases: a) Estudo da relação nitrato e amônio; b) Estudo do TDZ; c) Efeito do filtro amarelo; d) Estudo de meios de enraizamento; e) Efeito da micorriza na aclimatação. Os estudos foram realizados com três Clones, II, III e 800X. No estudo da relação nitrato e amônio com os três clones foram observadas diferenças na resposta quanto ao número de brotações entre os genótipos, sendo 39,40 mM a melhor concentração de nitrogênio para a indução de brotações no Clone II, 29,10 mM para o Clone III e 23,95 mM para o Clone 800X e as relações NO_3/NH_4 de 2,82; 4,65; 8,31, respectivamente. Quanto ao estudo do Thidiazuron, a melhor dosagem para regeneração de brotos adventícios para os três clones foi 0,05 mg/L. O nível de nitrogênio que proporcionou maior número de brotações com 0,05 mg/L de TDZ foi 49,70 mM que corresponde a 3/4 de nitrato de amônio e a uma relação de 2,21 de NO_3/NH_4 . O

* Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto. Membros da Banca: Amauri Alves de Alvarenga, Augusto Ramalho de Moraes e Eduardo Fonseca Arelló.

uso do filtro amarelo proporcionou maior crescimento das plântulas, maior concentração dos nutrientes e menor porcentagem de vitrificação. No estudo de enraizamento, a melhor dosagem de AIA foi à 2 mg/L, com metade da concentração dos sais (MS), favorecendo um melhor enraizamento (12 raízes/planta de 11 mm de comprimento) e uma boa qualidade da parte aérea (8 folhas/planta e comprimento de 31,9 mm). Quanto ao IBA a melhor dosagem foi à 0,1 mg/L por favorecer menor porcentagem de vitrificação (45%). Quanto a auxina empregada, a melhor dosagem de ANA foi 1,0 mg/L com 64% de vitrificação. No estudo da aclimação com micorrizas para o Clone II na maioria das avaliações a testemunha e *Gigaspora margarita* apresentaram resultados inferiores e dentre eles o *Glomus clarum* foi superior. A maior parte das avaliações para o Clone 800X, a testemunha e *Gigaspora margarita* também apresentaram resultados inferiores. Dos inóculos, a mistura dos três (inóculo múltiplo) apresentou resultados superiores para o ganho de matéria seca da parte aérea, número de folhas, matéria fresca de raízes e número de raízes. Para ambos os clones, os inoculados proporcionaram maior absorção de nutrientes principalmente N, P, Ca, Mg e Cu em relação à testemunha.

SUMMARY

PROPAGATION OF POT GERBERA THROUGH TISSUE CULTURE

The present work had as a purpose to improve micropropagation technics and acclimation of pot gerbera.

The trials were undertaken *in vitro* under greenhouse conditions, and subdivided into the following phases: a) study of nitrate:ammonium ratio; b) study of TDZ; c) effect of the yellow filter; d) study of rooting media; e) effect of the mycorrhiza upon acclimation. The studies were accomplished, with three Clones: II, III and 800X. Upon the study of the nitrate:ammonium ratio in the three clones, differences in the answer as to the number of sproutings among the genotypes, being 39.40 mm the best concentration of nitrogen for inducing sproutings in Clone II, 29.10 mm for Clone III and 23.95 mm for Clone 800X and the NO_3/NH_4 ratios of 2.82, 4.65, 8.31, respectively. As regards the study of Thiadizuron, the dosage for regeneration of adventitious shoots for the three clones was 0.05 mg/L. The nitrogen level which provided the greatest number of sproutings on 0.05 mg/L of TDZ was 49.70 mM which conforms to $\frac{3}{4}$ of ammonium nitrate and a NO_3/NH_4 ratio of 2.21. Use of the yellow filter afforded greater growth of the seedlings, increased concentration of the nutrients and decreased percentage of vitrification. On the study of rooting, the best dosage of AIA was 2 mg/L, with half the concentration of salts (MS), supporting a better rooting (12 roots/plant 11 mm long) and a good quality of the aerial part (8 leaves/plant

and 31.9 in length). Regarding IBA, the best dosage was 0.1 mg/L for promoting smallest percentage of vitrification (45%). As to the auxin employed, the best dosage of ANA was 1.0 mg/L with 64% of vitrification. On the study of acclimation with mycorrhiza for Clone II, in most of evaluations, the check and *Gigaspora margarita* presented poorer results and among them *Glomus clarum* was superior. In most of the evaluations for Clone 800X, the check and *Gigaspora margarita* also presented inferior results. Out of the inocula, the mixture of the three (multiple inoculum) presented superior results for gain of the shoot dry matter, number of leaves, root ^{→ fresh} dry matter and number of roots. To both clones, the inoculate presented increased nutrient uptake, mainly N, P, Ca, Mg and Cu relative the check.

1 INTRODUÇÃO GERAL

As técnicas de cultura de tecidos *in vitro* vêm expandindo as fronteiras na pesquisa básica em plantas superiores possibilitando sua aplicabilidade em diversas áreas tais como o melhoramento, genético de plantas, farmacologia, preservação de germoplasma obtenção de culturas livres de doenças e micropropagação.

Baseado no fenômeno da totipotência de células somáticas vegetais postulado por Haberlandt em 1902, a cultura de tecidos possibilita a regeneração de uma planta idêntica à planta mãe à partir de fragmentos de seus órgãos.

A gérbera é uma espécie ornamental de grande expressão na Europa, onde os maiores produtores são a Holanda, França, e Itália perfazendo um total de 62% do total da produção no Oeste da Europa. Na França representa 20% do total das 40 espécies ornamentais propagadas *in vitro* e na Inglaterra 16% de um total de 10 espécies são propagadas *in vitro*. Outros países como Polônia, Yugoslávia, União Soviética, Austrália, Nova Zelândia, Coreia, Norte da América, América do Sul e Central também produzem Gérbera através da cultura de tecidos (Bouzigues, 1987 e Pierik, 1991).

A produção de gérbera de corte e de vaso (minigérbera) no Brasil se concentra em Jaguariúna - SP na cooperativa Holambra responsável por 90% da produção nacional, onde existem pelo menos dois laboratórios de cultura de tecidos, um deles específico de Gérbera e

outro que produz diversas ornamentais inclusive Gérbera. Toda produção é praticamente consumida pelo mercado interno.

As géberas cultivadas atualmente são híbridas de *Gerbera jamesonii* e *Gerbera viridis* e são pertencentes à família Compositae com 50 espécies originárias da África e Ásia.

Sua propagação pode ser feita através de sementes e vegetativamente. Por ser uma planta alógama a propagação por sementes não é muito usada à nível comercial por originar progênies desuniformes, entretanto este método é útil para o melhoramento genético da espécie. O método mais utilizado para fins comerciais é o vegetativo, porém tem a desvantagem da disseminação de doenças através das sucessivas gerações de propagação clonal. A vantagem da propagação vegetativa reside no fato de se selecionar clones com características agronômicas desejáveis, tais como cor de flor, tamanho de flor, durabilidade da flor etc. O mercado tem valorizado a introdução de novos clones e este tem sido um fator de concorrência entre os produtores de gébera.

A micropropagação é uma técnica desenvolvida há mais de 30 anos. Tem sido amplamente usada a nível comercial por laboratórios com finalidade de multiplicação em larga escala de clones selecionados utilizando técnicas de cultura *in vitro* em um menor espaço de tempo e a preços competitivos.

Os produtores de gébera que se utilizam da cultura de tecidos devem se aprimorar em todas as etapas da propagação para poder competir no mercado. Essas etapas envolvem desde o estabelecimento *in vitro* até a aclimação das plantas.

Esse período compreende cinco estágios:

Estágio 0: seleção e preparação da matriz.

Estágio I: estabelecimento

Estágio II: multiplicação

Estágio III: preparação para o crescimento no ambiente natural (alongamento/enraizamento)

Estágio IV: transferência para o ambiente natural (aclimação).

O objetivo deste estudo foi aperfeiçoar os métodos de propagação *in vitro* através de gemas bem como a aclimação de três clones (II, III e 800X) de gérbera de vaso. Para tanto estudou-se a relação NO_3/NH_4 com e sem BAP para determinar a melhor taxa de multiplicação, o uso do filtro amarelo no crescimento e desenvolvimento de plântula, estudando ainda o enraizamento e a aclimação das plântulas com o uso de fungos micorrízicos (MVA).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOUZIGUES, P. La production de vitroplants pour l'horticulture ornementale en France. **Revue Horticole**, Paris, v.277, p.15-23, 1987.
- PIERIK, R.L.M. Comercial production in Poland and other Eastern European Countries. In: _____. **Micropropagation Technology and Application**. Netherlands: Klumer Academic Publishers, 1991. p.167-171.

2 EFEITO DA RELAÇÃO $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ COM E SEM BAP NA MULTIPLICAÇÃO DE GÉRBERA DE VASO À PARTIR DE GEMAS

RESUMO

Foram utilizados três Clones II, III e 800X para se testar dosagens de nitrato e de amônio no meio MS (0, 1/8, 1/4, 1/2, 3/4, 1/1 e 2/1) com e sem BAP. As melhores dosagens para a indução de brotações para os Clones II, III e 800X foram 1/2, 1/4 e 1/8 respectivamente, suplementado com 2 mg/L de BAP. Houve uma interação entre a relação de nitrogênio e o regulador de crescimento, ou seja, sem BAP, não ocorrendo indução de brotações. Os pesos de matéria fresca e seca aumentaram linearmente para os Clones II e III. Para o Clone 800X, os pesos de matéria fresca e seca se comportaram cubicamente, onde os máximos ocorreram à 1/4 e à 2/1 de nitrato de amônio. As diferentes concentrações de nitrato de amônio propiciaram vários graus de hiperhidricidade nas plântulas de gérbera de vaso.

2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

a) Estabelecimento e multiplicação com reguladores de crescimento

À partir do conceito da totipotência proposto por Haberlandt o estudo da progênese *in vitro* tem demonstrado que em cada fragmento dos órgãos de uma planta

permaneceriam os elementos à partir dos quais uma planta inteira poderia ser restaurada sob condições internas adequadas (Krikorian, 1982).

No caso de gérbera, existem diversos trabalhos onde se torna possível a regeneração de uma planta à partir de capítulos florais, gemas axilares, folhas e óvulos inférteis.

Em todos os métodos de estabelecimento e multiplicação seja por capítulo, gemas, óvulos inférteis ou folhas, notas-se o uso imprescindível de citocininas.

O BAP é uma das citocininas mais usadas tanto para regeneração quanto para multiplicação e o intervalo de concentração normalmente usado varia de 1 mg a 20 mg/L conforme dados anteriores (Hedtrich, 1979 e Sitbon, 1981).

A regeneração de gérbera à partir de capítulos é possível utilizando altas concentrações de citocininas e baixos níveis de auxina em meio básico contendo macro e micronutrientes (Pierik, Jansen, Maasdam, 1975; Barbosa, 1991; Huang, 1987 e Maia, 1982).

O sucesso da regeneração à partir de explantes de capítulos florais depende do estágio fisiológico do explante usado. Pawlowska (1977) estudou o melhor estágio de capítulo e constatou que explantes jovens de 1,0 a 1,5 cm proporcionaram o melhor resultado. Petru e Matous (1984), Laliberte, Chretien e Vieth (1985) também propagaram gérbera à partir de capítulos jovens.

Pierik, Steegmans e Ver Hagg (1982) reafirmaram que o sucesso da propagação clonal de gérbera tanto por capítulo como por gemas depende de altas concentrações de citocinina (5 a 20 mg/l de BA e 5 mg/l de cinetina).

Pierik, Steegmans, Ver Hagg (1982), ainda, citam que há respostas diferentes de diversos cultivares à vários níveis de BA. Barbosa (1991), regenerou plântulas da cultivar

Appelbloesem à partir de capítulos nas concentrações de 3,6 ou 9 mg/L de BAP e constatou que o 2,4D é prejudicial e o AIA não interfere na produção de brotos.

Meynet e Sibi (1983) também relatam que há uma alta interação entre genótipo e sistema de propagação. *In vitro* a diferença genotípica parece estar relacionada com a dominância apical.

Schiva, Lercari e Giusta (1982) testando 6 cultivares comerciais constataram diferentes respostas à diferentes níveis de cinetina (2-10 mg/L) mostrando alta herdabilidade.

O clássico trabalho de Skoog e Miller (1965) demonstrou a importância do balanço entre citocininas e auxinas para a divisão e crescimento celular em calos de tabaco. Na regeneração da gérbera, tem sido frequentes os trabalhos onde se obtém sucesso na organogênese com uso de elevadas concentrações de citocinina.

Blakesley, Lenton e Horgant (1991) através de estudos com carbono marcado, identificaram o 6-benzilamino-9 glucosilribosil purina como metabólito do BAP em pecíolos e calos de *Gerbera jamesonii in vitro*, mostrando a importância dessa citocinina na regeneração e propagação da gérbera.

Na regeneração de gérbera cultivar Vulkan, à partir de folhas de plantas multiplicadas *in vitro*, Hedtridt (1979) usou meio MS modificado e suplementado com 1 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de GA₃.

A regeneração de plântulas de gérbera à partir de óvulos inférteis possui a finalidade de obter plantas haploides para serem utilizadas em programas de melhoramento. Ahmin e Vieth (1986) e Meynet e Siki (1984) obtiveram regeneração de plântulas haploides a partir de óvulos inférteis formando calos que originaram plântulas. Sitbon (1981) obteve também plantas

haploides a partir de óvulos inférteis das cultivares Appelbloesem, Clementine, Lambda e Pimpernel em meio MS contendo 2 mg/L de BAP, 2 mg/L de cinetina e 0,5 mg/L de AIA.

Pierik, Steegman, Wonters (1979) salientaram que a regeneração da planta a partir de gemas apicais são recomendadas para propagação em massa de regeneração de plântula, pois sua regeneração não passa pela fase de calos. Raatle (1978) relatou a utilização de cultura de meristemas para propagação de gérberas na Holanda. Gregorini, Lorensi e Lancioni (1976) utilizaram gemas apicais para multiplicação clonal de gérberas utilizando como citocinina a zeatina ribose.

A citocinina assim como o nitrogênio está relacionada com o fenômeno de vitrificação, principalmente quando usada em excesso (Kevers, Coumans, Coumans-Gilles, 1984).

Bornman e Vogelmann (1984) obtiveram bons resultados quando aplicaram BA por 2h na concentração de 28 mg/L em um meio sem hormônio com 10 g/L de agar em *Picea abies*.

Reynoird, Chriqui, Noin (1993) estudando diversos tipos e concentrações de citocininas obtiveram melhor resultado usando 2 mg/L de BA em gérbera.

b) Relação $\text{NO}_3:\text{NH}_4$

O meio básico normalmente utilizado na fase de multiplicação é o MS Murashge e Skoog (1962), entretanto vários trabalhos vêm mostrando ser um meio muito rico em sais causando até toxidez e outros problemas fisiológicos.

Schum e Bichler (1986) obtiveram melhores resultados em regeneração de gérbera usando meio de Pierik, Jansen, Maasdam e Binnendijk (1975) que é metade da concentração dos sais do MS com 1% de açúcar e 5 mg/L de BAP.

Todos os componentes de um meio de cultura podem afetar a morfogênese *in vitro* todavia recentemente, as atenções têm se voltado para o nitrogênio e, em especial, ao nitrogênio reduzido (Ammirato, 1985).

Uma das razões para a importância do nitrogênio reduzido no metabolismo vegetal é devido a amônia ser rota primária pela qual este elemento é incorporado em compostos orgânicos (Grey e Powcer, 1987)

O nitrogênio é algumas vezes absorvido pelas plantas na forma orgânica, mas geralmente é suplementado na forma de íons NH_4^+ e NO_3^- . A maioria das plantas preferem NO_3^- ao NH_4^+ e, em alguns casos o oposto, para tanto é necessário encontrar o balanço certo de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ para um ótimo crescimento e desenvolvimento *in vitro*. Se as plantas absorverem íons NH_4^+ , o pH diminuirá e o ágar pode tornar-se líquido. Como resultado de um baixo pH pelo NH_4^+ sua absorção diminui e aumenta a absorção de nitrogênio na forma de NO_3^- .

Bespalkok, Vieira e Hashimoto (1992) estudaram a influência da concentração de nitrato de amônia na indução de brotos *in vitro* de *Stevia rebaudiana* e constataram que a concentração de nitrato de amônia do MS é tóxica e obteve maior indução de brotações usando 1/4 de nitrato de amônio do MS. Relataram ainda que não é possível afirmar se o aumento do número de brotos foi devido à diminuição de nitrogênio ou ao aumento da relação entre nitrato e amônia.

Abu-Qaoud, Shirvin e Below (1992) constataram que a regeneração em *Pyrus communis*, foi alterada com diferentes razões de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$. A melhor regeneração obtida foi para a relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ de 1:2 ou 1:3.

Em macieira quando a razão de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ foi de 1:2 à 1:1 o número de gemas regeneradas diminuiu (Fasolo, Zimmerman e Fordham, 1989).

Nagakubo, Nagakawa e Olkama (1993) constataram que a alta razão de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ no meio de multiplicação promoveu a formação de gemas e diminuiu a “vitrificação”.

Do e Carmier (1991) verificaram que a alta concentração do íon amônio no meio de cultura reduziu a acumulação de antocianina.

No crescimento da batata Cao e Tibbits (1992) usando misturas de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (0:100%, 20:80%, 40:60%, 60:40%, 80:20% e 100:0%) perfazendo-se um total de 4 mM de N constataram que os tratamentos contendo nitrato e amônio aumentaram significativamente o peso de matéria seca e área foliar quando comparados aos tratamentos contendo somente NO_3 ou NH_4 . As plantas cresceram melhor na presença de NO_3 em relação à NH_4 . O NO_3 proporcionou elevações nas concentrações de Ca, Mg, Fe e Mn e reduziram as de P, S, Cl, B, Zn e Cu nas brotações (Cao e Tibbits, 1992).

Além da importância do nitrogênio na forma NO_3 e NH_4 no incremento das plântulas, muitos autores têm relacionado o fenômeno de hiperhidricidade ou vitrificação com o nitrogênio.

As desordens na hiperhidricidade ou vitrificação tem caráter morfológico (gemas com internódios curtos e rosetadas e folhas finas, alongadas e translúcidas, podendo a cor pode ser anormal) e caracter anatômico (hipertrofia do parênquima, grandes espaços intercelulares, hipolignificação do sistema vascular e uma redução e ou anomalia do sistema vascular entre outros) (Debergh, Aitken-Christie e Cohen, 1992).

Daguin e Letouze (1985) variando dois meios básicos (MS e Knop) diluídos pela metade e variando o suplemento de nitrogênio mostraram que a vitrificação é diretamente associada com o amônio contido no meio de cultura.

Daguim e Letouze (1986) relataram que a vitrificação de *Salix babylonica* pode ser controlada pela quantidade de nitrogênio amoniacal no meio de cultura, relatando ainda que na concentração original do MS todas as plântulas são vitrificadas. Em plantas vitrificadas de *Salix babylonica*, a lignina contida nas gemas é reduzida à 50%.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado constituiu-se de explantes secundários (plântulas) provenientes da Cooperativa Holambra, Município de Jaguariúna, no Estado de São Paulo, oriundos de vários clones denominados II, III e 800X, e gentilmente cedido pelo pesquisador Eng^o Agr^o MS. Eduardo F. Mello. As plântulas utilizadas possuíam 2 folíolos e aproximadamente 10 mm de comprimento.

Para testar a relação e a concentração de nitrogênio total no meio de cultura suplementado ou não com BAP, variou-se as concentrações de Nitrato de amônio da solução original do MS conforme a Tabela 1.

Para os Clones III e 800X foram acrescentados dois tratamentos com e sem BAP com o dobro da concentração de nitrato de amônio, ou seja, 41,20 mM, com nitrogênio total de 101,20 mM e a relação NO_3/NH_4 de 1,46 e NH_4/NO_3 de 0,69.

TABELA 1. Concentração (mM) de NH_4NO_3 , NO_3 , NH_4 , N total e relação NO_3/NH_4 , com ou sem 2 mg/L de BAP, para gérbera de vaso Clones II, III e 800X. ESAL, Lavras - MG, 1994.

Tratamentos		NH_4NO_3 (mM)	NO_3 (mM)	NH_4 (mM)	N Total (mM)	Relação NO_3/NH_4
Sem BAP	Com BAP (2 mg/L)					
T ₁	T ₇	0	18,80	0	18,80	-
T ₂	T ₈	2,57	21,37	2,57	23,94	8,32
T ₃	T ₉	5,15	23,90	5,15	29,90	4,65
T ₄	T ₁₀	10,30	29,10	10,30	39,40	2,82
T ₅	T ₁₁	15,45	34,25	15,45	49,70	2,21
T ₆	T ₁₂	20,60	39,40	20,60	60,00	1,91

O meio de cultura básico utilizado foi o de Murashige e Skoog, 1962 (MS), acrescido 6,0 g/L de agar (agar-agar DAB-6 Merck), com pH ajustado para 6,0 e autoclavado por 20 minutos a uma temperatura de 121°C à pressão de 1 atm.

As plântulas foram inoculadas em câmaras de fluxo laminar horizontal em condições estéreis e transferidas para a sala de crescimento com um fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, e intensidade luminosa de 1500 lux.

As características avaliadas após 30 dias foram as seguintes: Peso das matérias fresca e seca da parte aérea e raízes, comprimento da parte aérea e da raiz, número de brotos e de folhas e porcentagem de vitrificação.

Os pesos das matérias fresca e seca foram obtidos através de uma balança de precisão. O material foi colocado em estufa à 70°C até estabilização do peso de matéria.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos dispostos em um esquema fatorial 2 x 6 (Clone II) e 2 x 7 (Clones III e 800X) onde os fatores foram BAP e dosagens de nitrato de amônio.

Para o Clone II usou-se 5 repetições com 4 plântulas por repetição. As plântulas foram inoculadas em tubos de ensaio de 25 × 150 mm com 10 mL de meio de cultura, para o Clone III, utilizou-se 7 repetições com 3 três plântulas por repetição e 6 repetições com 3 plântulas para o Clone 800X e as plântulas foram inoculadas em frascos de 350 mL tipo frasco para embalagem de azeitona.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Peso das matérias fresca e seca da parte aérea

a) Clone II

Os tratamentos na presença de BAP apresentaram peso de matéria fresca e seca significativamente maiores que os tratamentos sem BAP. A matéria fresca com BAP foi 3 vezes maior que aquela sem BAP, enquanto que, a matéria seca com BAP foi 2,3 vezes maior que sem BAP (Tabela 2).

TABELA 2. Valores médios dos pesos e matérias fresca e matéria seca da parte aérea de gérbera de vaso Clones II, III e 800X na relação com BAP/sem BAP em função da ausência e presença de BAP (2 mg/L). ESAL, Lavras - MG, 1994.

Clone	Matéria fresca P.A. (mg)			Matéria seca P.A. (mg)		
	Com BAP	Sem BAP	Com BAP/Sem BAP	Com BAP	Sem BAP	Com BAP/Sem BAP
II	391,8a*	130,3b	3,0	130,5a*	57,7b	2,3
III	1.399,4a*	310,2b	4,5	81,7a*	12,3b	6,6
800X	715,0a*	172,0b	4,2	32,6a*	14,0b	2,3

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

Quanto aos efeitos dos níveis de nitrato de amônio para peso de matéria fresca e seca houve um aumento linear ao elevar-se as dosagens de nitrato de amônio, conforme se observa na Figura 1.

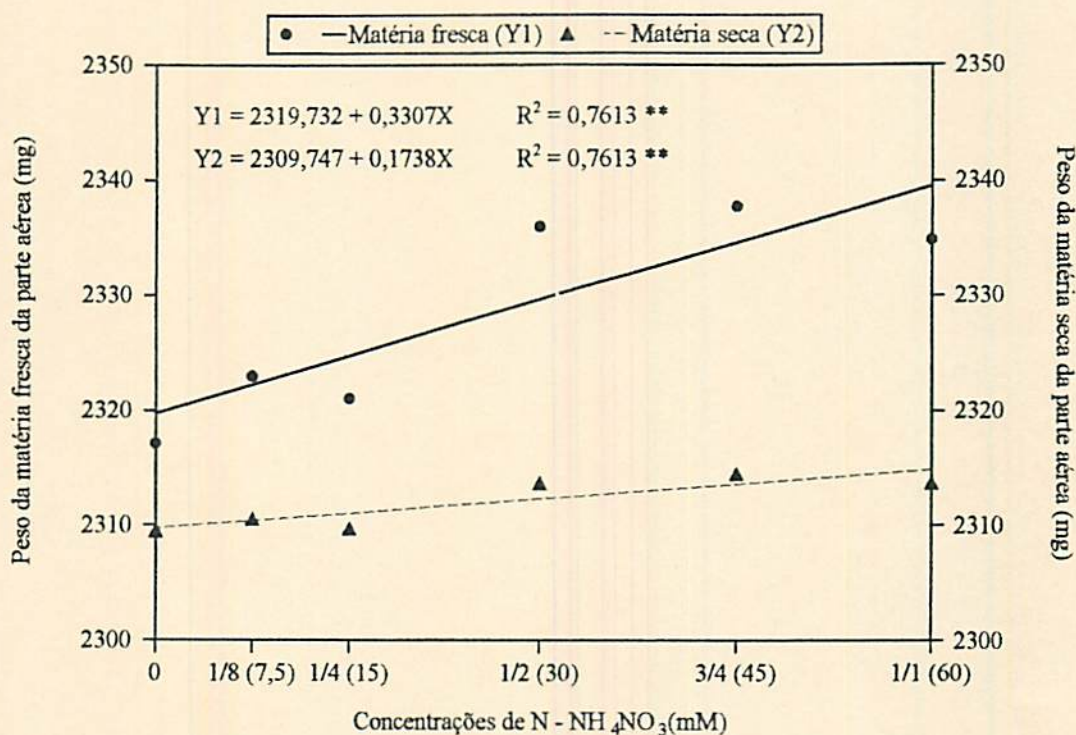


FIGURA 1. Representação gráfica do efeito das concentrações de N na forma de NH₄NO₃ sobre os pesos das matérias fresca e seca da parte aérea de gérbera de vaso Clone II. ESAL, Lavras - MG, 1994.

b) Clone III

Para este clone as plântulas submetidas aos tratamentos com BAP apresentaram pesos de matéria fresca e seca significativamente maiores que os tratamentos sem BAP. A matéria fresca com BAP foi 4,5 vezes maior que sem BAP e a matéria seca 6,6 vezes.

Ao se estudar os níveis de nitrato de amônio verificou-se efeito significativo sobre a variável peso de matéria fresca da parte aérea. Ainda, verificou-se efeito significativo da interação

BAP \times níveis de nitrato para a variável peso de matéria fresca da parte aérea (Tabela 2). Dessa maneira, para matéria fresca sem BAP a curva representativa foi quadrática com os valores mínimos para $x = 47$, e os máximos foram a 0 e 120. Para matéria fresca com BAP a curva se comportou cúbicamente, e o maior peso foi à 1/2 (30) da concentração do MS. Quanto ao peso de matéria seca não houve interação entre níveis de nitrato e BAP e a curva característica foi a cúbica, onde o maior peso foi à 2/1 da dosagem original do MS (Figura 2) e o valor mínimo ocorreu na dosagem de 41.

c) Clone 800X

Este clone quanto ao BAP também apresentou o mesmo resultado que os anteriores, ou seja, o peso de matéria fresca e seca com BAP, foram significativamente superiores aos sem BAP, sendo que, a matéria fresca com BAP foi 4,2 vezes superior e a matéria seca com BAP foi 2,3 superior em relação à matéria seca sem BAP (Tabela 2).

Quanto às dosagens de nitrato de amônio o peso de matéria seca da parte aérea pode ser descrito através de uma curva cúbica, onde o máximo em peso de matéria seca ocorreu com a dosagem de 20 (correspondendo à 1/3 de NH_4NO_3 em relação ao MS) e para peso de matéria fresca ocorreu com a dosagem de 26, conforme pode-se visualizar na Figura 3.

Para os três clones foi observado a presença de entumescimento na base dos brotos com BAP provocando um aumento no peso de matéria fresca.

Os Clones II e 800X não apresentaram interação entre o nitrato de amônio e o BAP, apenas o Clone III apresentou interação quanto à matéria fresca. Para Clone III o BAP provavelmente potencializou o efeito das dosagens de nitrato de amônio.

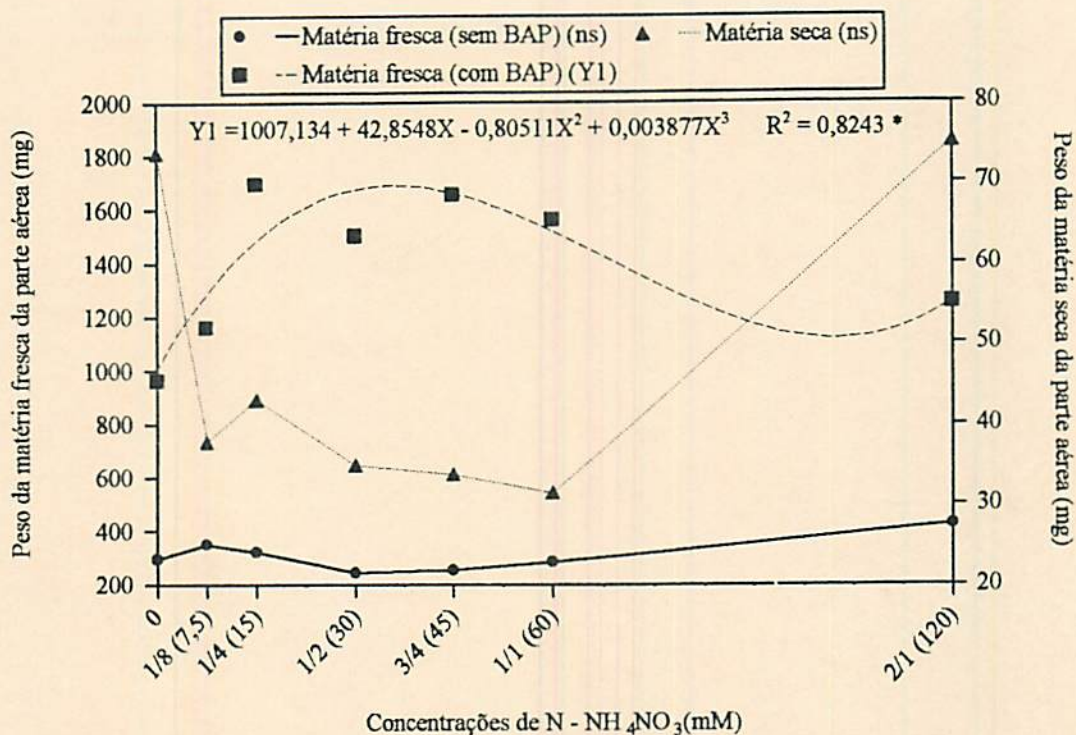


FIGURA 2. Representação gráfica do efeito das concentrações de N na forma de NH_4NO_3 com e sem BAP (2 mg/L) sobre o peso das matérias fresca e seca da parte aérea de gérbera de vaso Clone III. ESAL, Lavras - MG, 1994.

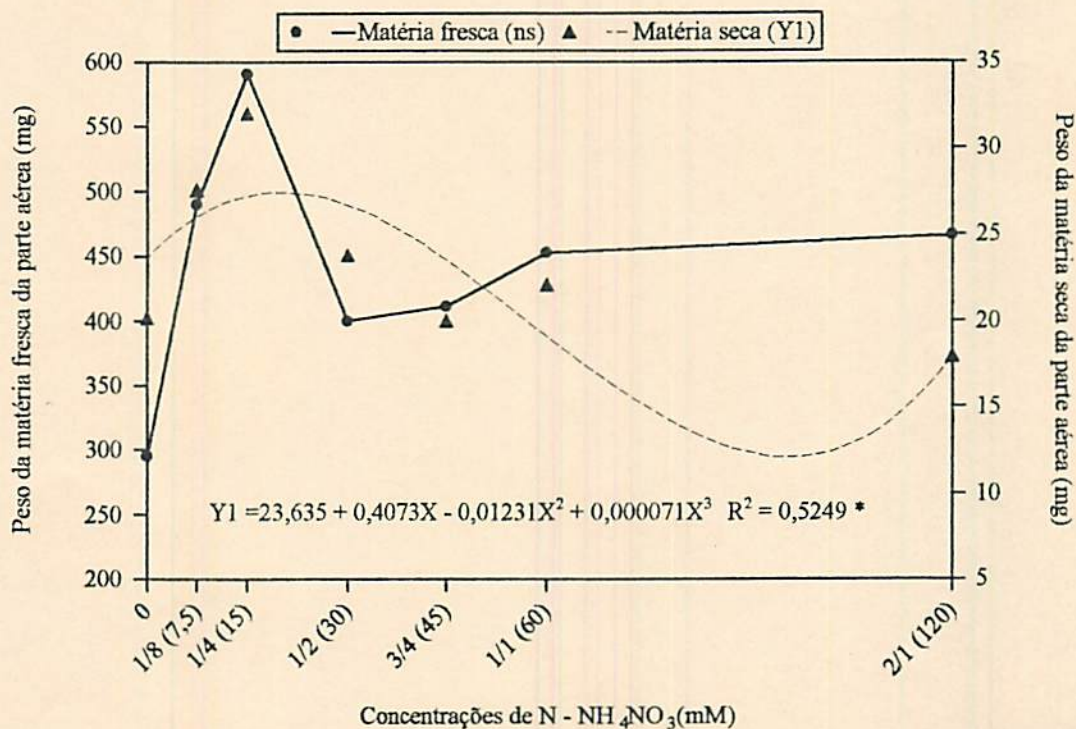


FIGURA 3. Representação gráfica do efeito das concentrações de N na forma de NH_4NO_3 sobre os pesos das matérias fresca e seca da parte aérea de gérbera de vaso Clone 800X. ESAL, Lavras, MG, 1994.

Conforme Esashi e Leopold (1969) as citocininas são importantes no incremento de matéria fresca na cultura de tecidos de tabaco e cotilédones e *Xanthium pensylvanium* Wallr.. A mesma conclusão obteve-se para os três clones onde a citocinina BAP foi marcadamente importante no incremento de matéria fresca e seca não só pela indução de brotações mas também pela presença de entumescimento na base dos brotos. Rayle, Ross e Robinson (1982) citaram que a citocinina estimulou o crescimento de cotilédones de abóbora provocando aumento no peso de matéria fresca e seca.

Tepfer e Fosket (1978) estudando células de soja cultivadas com citocininas provaram através da análise de poliribossomos que a citocinina regula a síntese protéica provocando um incremento de massa vegetal.

Evans e Sorger (1966) mostraram que o nitrogênio é um importante componente de aminoácido, proteínas, ácidos nucléicos, nucleotídeos, coenzimas, hexasaminas, etc. O aumento de nitrato de amônio, fonte de nitrogênio, provocou incremento de matéria fresca e seca para o Clone II. Os Clones III e 800X se comportaram conforme uma curva cúbica onde os máximos se aproximam das dosagens com maior número de brotos e menor número de brotos. O aumento no peso fresco com menor número de brotos foi devido à presença de entumescimento na base do explante, indicando o início da calogênese.

2.3.2 Peso de matéria fresca e seca da raiz

O peso de matéria fresca e seca de raiz foi avaliado somente para o Clone II. Para os tratamentos com BAP não houve indução de enraizamento (Figura 4), isto também se observou nos outros dois clones (Figura 5), mostrando o efeito inibitório dessa concentração de citocinina

no enraizamento. Skoog e Miller (1965) observaram que altos níveis de citocinina em relação à auxina estimularam a formação de gemas em segmentos ou calos de tabaco. Na concentração de 2 mg/L de BAP houve indução de gemas e sem BAP formaram-se raízes, mostrando dessa maneira que sem o BAP a auxina endógena estimulou a formação de raízes.

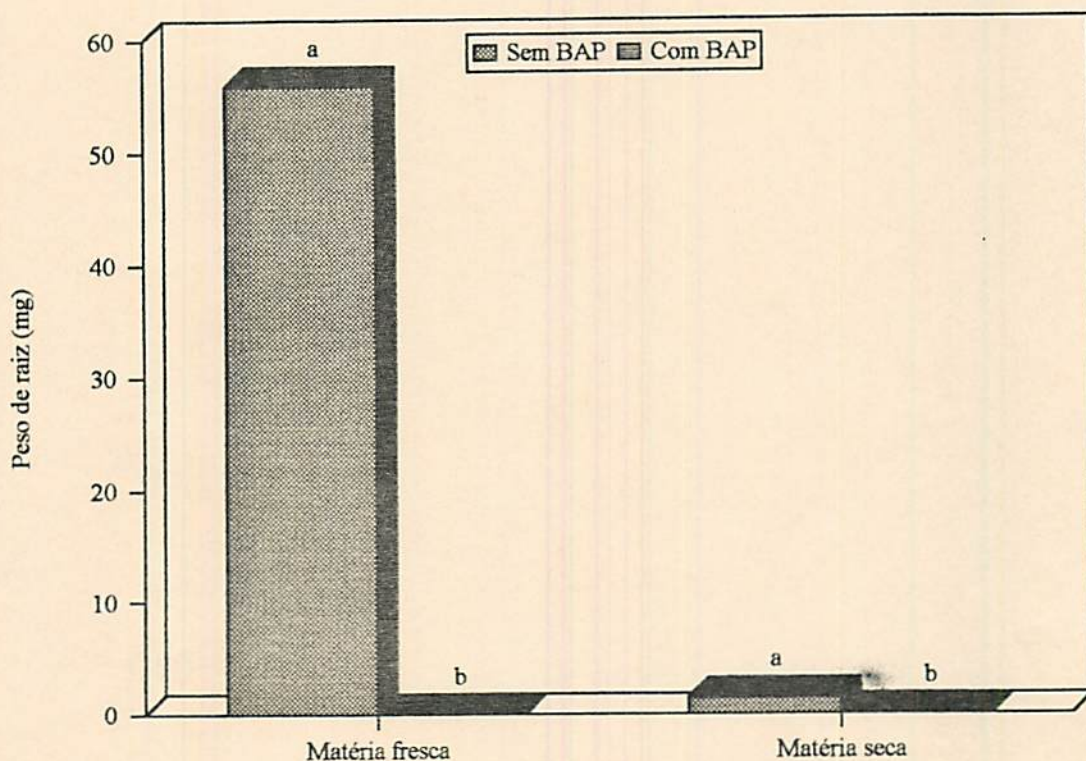


FIGURA 4. Representação gráfica dos pesos das matérias fresca e seca das raízes gérbera de vaso Clone II em função da ausência e presença de BAP. ESAL, Lavras - MG, 1994.

A matéria fresca se comportou conforme uma curva cúbica onde atingiu maior incremento à 3/4 da dosagem de nitrato de amônio e matéria seca, também se comportou conforme uma curva cúbica onde o maior incremento foi próximo de 3/4 (Figura 6).

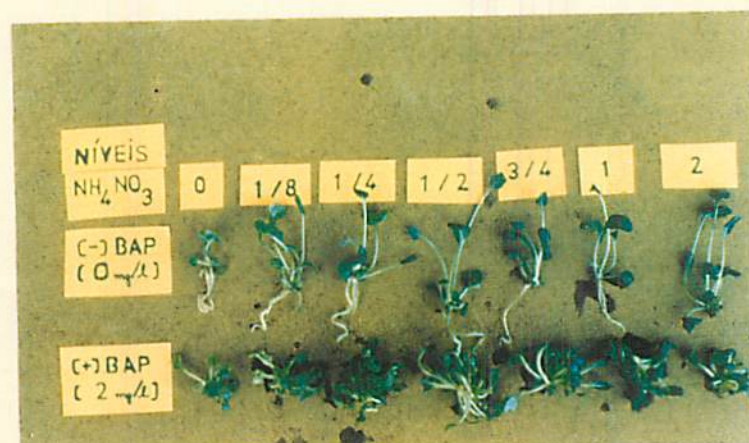
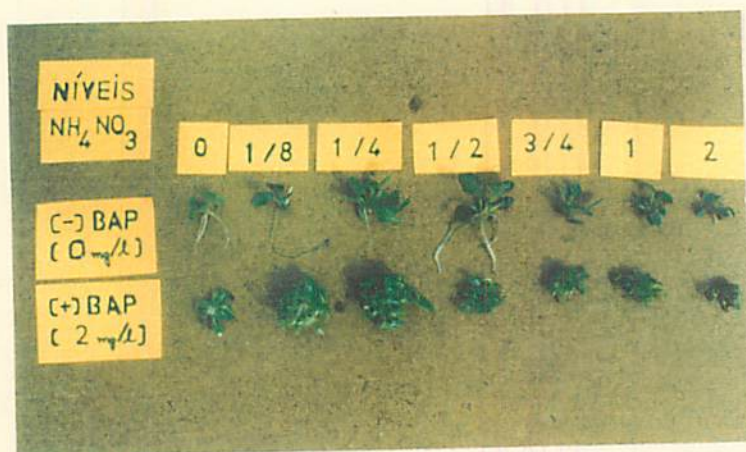
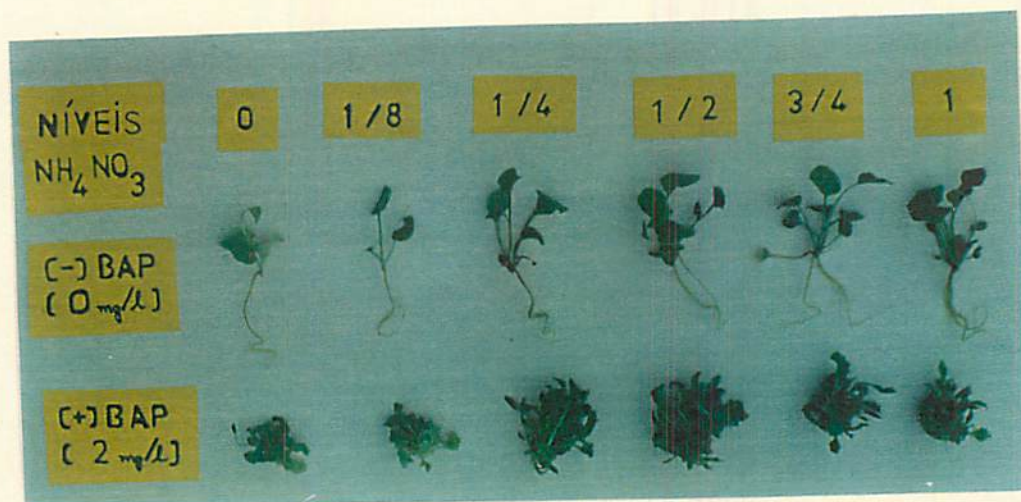


FIGURA 5. Fotografias ilustrativas dos experimentos de nitrato de amônio com e sem BAP de gérbera de vaso Clones II, III e 800X. ESAL, Lavras - MG, 1994.

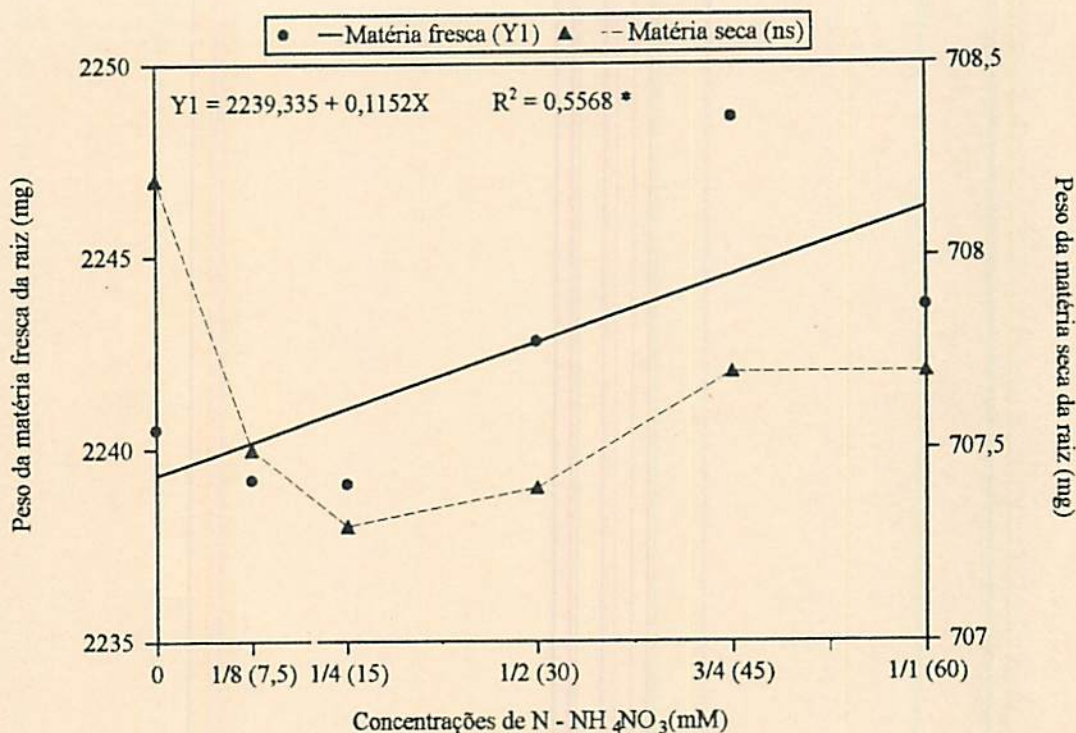


FIGURA 6 .Representação gráfica do efeito das concentrações de N na forma de NH_4NO_3 nos pesos das matérias fresca e seca das raízes de gérbera de vaso Clone II. ESAL, Lavras - MG, 1994.

Os estudos de Luttge e Higinbotham, (1979) indicam que o NO_3^- assim como outros íons são absorvidos ativamente por células epidérmicas e corticais e são mantidas no xilema num gradiente eletroquímico quando comparado com o meio externo. À partir daí o movimento final dos íons para o xilema pode ser por difusão passiva, provavelmente a dosagem de 3/4 proporcionou uma concentração de nitrato que acelerou este processo.

O processo de assimilação de nitrato de amônio é muito complexo pois envolve diversos fatores como enzimas extremamente específicas na redução do nitrato para nitrito e deste para amônio. Sabe-se que o nitrato induz a síntese de novo da enzima que reduz o nitrato (Hewitt, 1983). Esse processo depende da concentração do substrato, no caso nitrato de amônio. Dessa maneira, podemos inferir que a concentração de 3/4 de nitrato de amônio provocou uma maior

indução da enzima resultando em um maior incremento radicular e conseqüentemente maior incremento da parte aérea também.

2.3.3 Comprimento da parte aérea

Para o Clone II os tratamentos sem BAP apresentaram comprimento da parte aérea significativamente maior em relação aos tratamentos com BAP (Tabela 3). Isto é devido o efeito inibitório do BAP no crescimento e desenvolvimento da plântula induzindo maior número de células mas com tamanho pequeno.

TABELA 3. Valores médios de comprimento e número de folhas, com e sem BAP, em função das dosagens de nitrogênio, para os Clones II, III e 800X de gérbera de vaso. ESAL, Lavras - MG, 1994.

NH ₄ NO ₃ (x)	N (mg) total	Comprimento (mm)						Número de folha					
		Com BAP			Sem BAP			Com BAP			Sem BAP		
		II	III	800X	II	III	800X	II	III	800X	II	III	800X
0	18,80	15,6	14,8	13,2	27,7	30,4	19,0	13,1	7,5	27,1	5,9	3,5	7,7
1/8 (7,5)	23,95	14,6	22,5	15,5	31,2	31,5	23,6	14,1	21,2	45,2	4,5	2,6	5,5
1/4 (15)	29,10	12,5	21,5	17,5	25,2	29,2	25,4	18,1	33,0	43,8	4,6	1,9	7,9
1/2 (30)	39,40	16,1	23,4	14,3	27,9	19,0	24,2	24,4	24,2	42,0	6,8	1,4	7,0
3/4 (45)	49,70	18,0	26,0	14,2	31,2	19,7	19,9	14,4	18,9	37,8	6,6	1,3	7,3
1/1 (60)	60,00	16,7	24,4	14,2	27,6	24,4	20,5	14,9	16,9	4,0	7,5	1,8	7,6
2/1 (120)	101,20	-	25,3	13,1	-	51,1	13,1	-	13,5	1,9	-	4,2	4,9
x		15,6 b*	22,6 b	14,6 b	28,4 a*	29,4 a	20,8 a	16,3 a	19,3 a	36,6 a	6,0 b	2,4 b	6,9b

$$Y_{II} = 25,05745 - 0,003787X + 0,00017763X^2 - 0,000001925X^3 \quad r^2 = 68\%$$

$$Y_{II} = 3,708947 + 0,0271710X - 0,00039001X^2 \quad r^2 = 52\%$$

Sem BAP:

$$Y_{III} = 32,34815 - 0,04952007X + 0,00054459X^2 \quad r^2 = 95\%$$

$$Y_{III} = 3,372239 - 0,1252244X + 0,00220302X^2 - 0,000009184X^3 \quad r^2 = 99\%$$

Com BAP:

$$Y_{III} = 20,30613 + 0,0058462X \quad r^2 = 68\%$$

$$Y_{III} = 18,281936 + 0,1667859X - 0,00181014X^2 \quad r^2 = 69\%$$

Sem BAP:

$$Y_{800X} = 22,21734 + 0,0042666X - 0,00010069X^2 \quad r^2 = 73\%$$

$$Y_{800X} = 6,765112 + 0,0390737X - 0,00045265X^2 \quad r^2 = 60\%$$

Com BAP:

$$Y_{800X} = 15,044 - 0,0000166X - 0,00001410X^2 \quad r^2 = 45\%$$

$$Y_{800X} = 36,275225 + 0,2743309X - 0,0034403X^2 \quad r^2 = 68\%$$

(*) comparação entre com e sem BAP, dentro de cada clone.

Quanto as dosagens de nitrato de amônio com BAP e sem BAP se comportaram conforme uma curva cúbica.

O Clone III também apresentou maior comprimento quando os tratamentos não estavam na presença de BAP.

Quanto as dosagens de nitrato de amônio sem BAP o comprimento se comportou conforme uma curva quadrática, sendo os extremos 0 e 2 de nitrato de amônio apresentando os maiores comprimentos. Com BAP o Clone III se comportou segundo uma reta crescente. Mostrando dessa maneira interação do BAP com as dosagens de nitrato de amônio.

Para o Clone 800X o comprimento da parte aérea também foi significativamente maior nos tratamentos sem BAP.

Ao estudarmos as dosagens o comprimento da parte aérea se comportou segundo uma curva quadrática onde o ponto máximo com e sem BAP foi à 1/4 da dosagem.

Arelló (1991) também observou que na ausência de BAP a *Kielmeyera coriacea* propiciou maior comprimento. Fato semelhante ocorreu com os três clones.

Quanto as dosagens de nitrato de amônio com e sem BAP os clones se comportaram distintamente, provavelmente devido ao genótipo do material estudado.

2.3.4 Número de brotos

Conforme Figura 7, 8 e 9 os três clones mostraram a necessidade de uso de regulador de crescimento (citocinina) para a indução de brotações. Barbosa (1991) também mostrou que a gérbera de corte cultivar *appelbloesem* requer regulador de crescimento para regeneração de brotações adventícias.

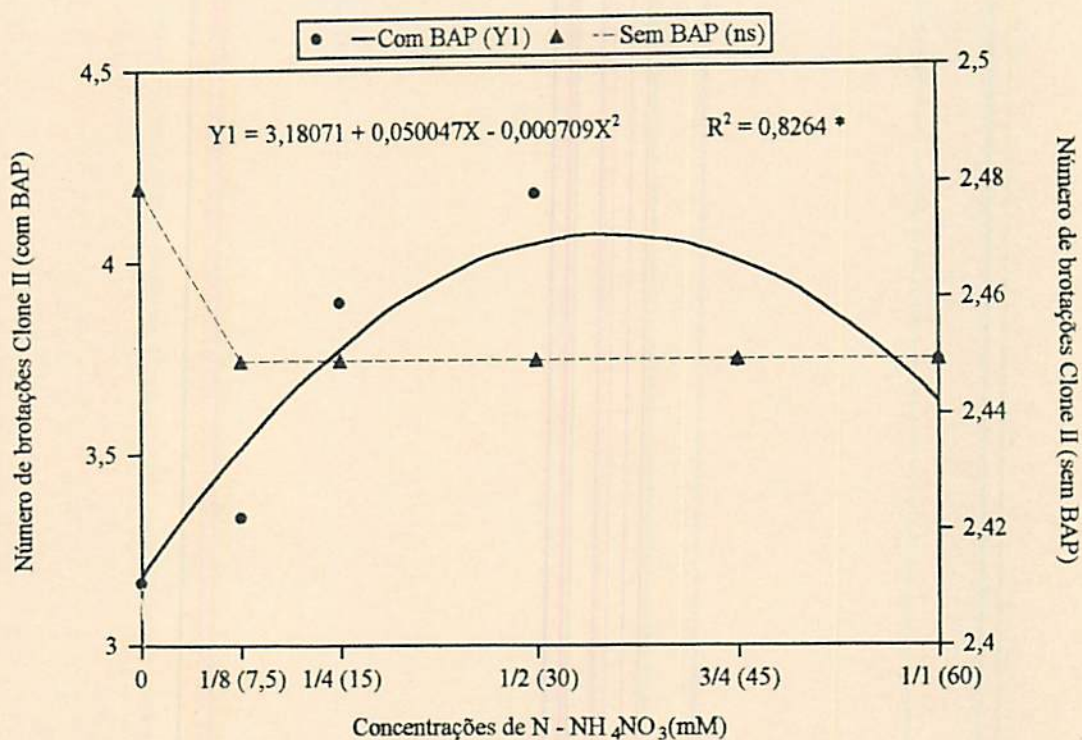


FIGURA 7. Representação gráfica do efeito das concentrações de N na forma de NH_4NO_3 , com e sem BAP, sobre o número de brotações de gérbera de vaso Clone II. ESAL, Lavras - MG, 1994.

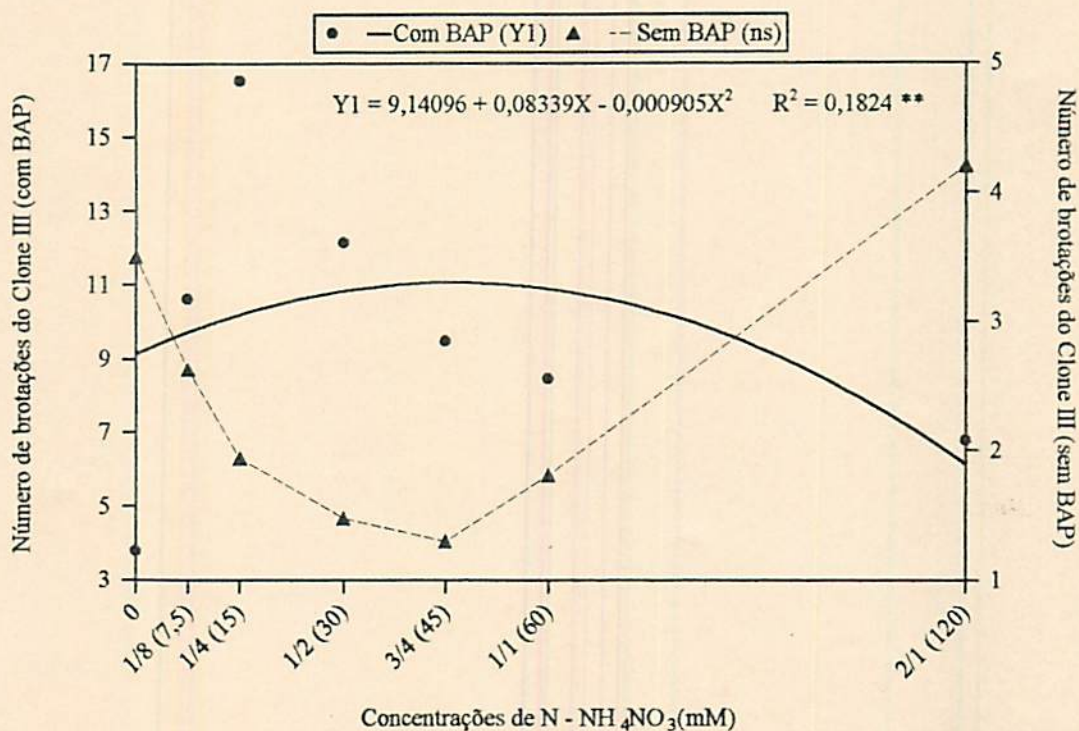


FIGURA 8. Representação gráfica do efeito das concentrações de N na forma de NH_4NO_3 , com e sem BAP, sobre o número de brotações de gérbera de vaso Clone III. ESAL, Lavras - MG, 1994.

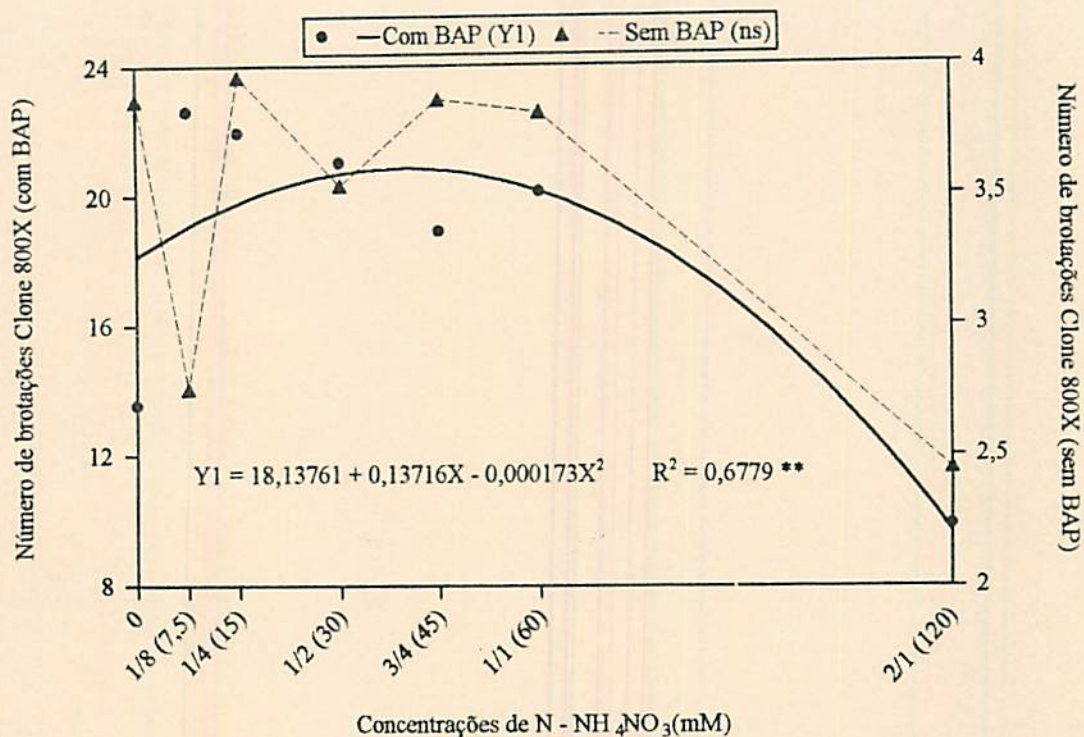


FIGURA 9. Representação gráfica do efeito das concentrações de N na forma de NH_4NO_3 , com e sem BAP, sobre o número de brotações de gérbera de vaso Clone 800X. ESAL, Lavras - MG, 1994.

Nos tratamentos sem BAP não houve indução de brotações, mesmo variando as dosagens de nitrogênio. Os dados indicam que há necessidade de interação do nitrogênio com o BAP para maior regeneração das brotações. Para o Clone II, a dosagem 39,40 mM de nitrogênio total suplementado com BAP, que corresponde à metade da concentração de nitrato de amônio do meio MS (10,3 mM NH_4NO_3) e a uma relação NO_3/NH_4 de 2,82, induziu maior número de brotações adventícias. Por outro lado para o Clone III a dosagem 29,10 mM de nitrogênio total suplementado com BAP corresponde à 1/4 da concentração de nitrato de amônio do meio MS (5,15 NH_4NO_3) e à uma relação NO_3/NH_4 de 4,65, induziu maior número de brotações adventícias. Finalmente para o Clone 800X a dosagem 23,95 mM de nitrogênio total

suplementado com BAP, correspondente à 1/8 da concentração de nitrato de amônio do meio MS (2,57 NH_4NO_3) e à uma relação NO_3/NH_4 de 8,32 foi a que induziu maior número de brotações.

Os resultados obtidos indicam que a concentração de NH_4NO_3 do meio MS inibiu a indução de brotos adventícios, sendo necessário uma boa relação entre NO_3 e NH_4 regeneração.

Com o aumento das dosagens de nitrogênio o número de brotações adventícias diminuiu mostrando que a concentração de N no meio de MS foi tóxico inibindo a indução de brotações.

Conforme Bessalok, Vieira e Hashimoto (1992) o nitrogênio também foi tóxico para regeneração de brotações de *Stevia rebaudiana*. Os autores mostraram que é importante a diminuição de NH_4NO_3 do MS para 5,15 mM para otimizar a indução de brotações adventícias. Os resultados presentes, mostraram que há necessidade de reduzir a concentração de NH_4NO_3 de 20,6 mM para 10,3 mM (Clone II), 5,15 mM (Clone III) e 2,5 mM (Clone 800X) para induzir maior número de brotos adventícios. Este resultado é confirmado em várias espécies de ornamentais como *Heliconia* spp. (Nannetti, Sato e Pinto, 1994) e cravo (Cuzzuol, Gallo e Crocomo, 1993).

Os resultados obtidos indicam que a interação entre o BAP e o nitrogênio são importantes para induzir brotos adventícios. Entretanto, não se pode afirmar que este aumento do número de brotos seja devido à concentração do nitrogênio ou devido à relação nitrato e amônio. Estes resultados mostram que a concentração de nitrogênio reduziu de 60 mM para 39,40 mM (Clone II), 20,10 mM (Clone III) e 23,95 mM (Clone 800X) e a relação de nitrato e amônio aumentou de 1,91 para 2,82 (Clone II). Os dados mostram ainda que há uma diferença em respostas ao número de brotações em relação ao nitrogênio e à relação NO_3/NH_4 . O Clone 800X responde melhor do que o Clone II em menores concentrações de nitrogênio. Entretanto, a

relação NO_3/NH_4 é aumentada para o Clone 800X (8,32) de 2,82 (Clone II) para 8,32 (Clone 800X). A redução de nitrogênio do Clone II para o Clone 800X é de 1,5x (39,40 mM para 23,95 mM), em compensação, a relação NO_3/NH_4 é aumentada em 3x (2,82 para 8,32). Outros trabalhos mostraram um aumento da indução em brotos adventícios com a redução na concentração de nitrogênio (Bespalhok, Vieira e Hashimoto, 1993; Geier, 1986; Gertsson, 1988; Wainwright e Flegmann, 1985; Welander, 1979) e sobretudo quando se aumentou a relação nitrato/amônia (Zens e Zimmer, 1986).

2.3.5 Número de folhas

Para o Clone II o número de folhas nos tratamento com BAP foram significativamente superiores do que sem BAP.

A dosagem de nitrato de amônio que forneceu maior número de folhas foi a mesma que resultou no maior número de brotações, a concentração de 39,40 mM de nitrogênio que corresponde à metade da concentração de nitrato de amônio e à uma relação de NO_3/NH_4 de 2,82.

O Clone III tratado com BAP também foi significativamente superior em número de folhas do que o mesmo clone não tratado, e a uma dosagem inferior de nitrogênio (29,10 mM), que corresponde à 1/4 da dosagem de nitrato amônio do MS e a uma relação de NO_3/NH_4 de 4,65 foi a que proporcionou o maior número de folhas.

O Clone 800X com BAP foi superior em número de folhas do que sem BAP. A dosagem de nitrogênio, na presença de BAP que proporcionou um maior número de folhas foi aquela correspondente a 1/8 da dosagem de nitrato de amônio do MS, ou 23,95 mM de nitrogênio, com uma relação NO_3/NH_4 de 8,31.

O meio de cultura sem regulador de crescimento para cada clone apresentou diferenças nos resultados, mostrando curvas difíceis de serem explicadas. Para o Clone II a resposta foi quadrática sendo o ponto máximo, o mesmo obtido com BAP. O Clone III comportou-se segundo uma curva cúbica onde os máximos foram à 1/4 e a 1/1 de nitrato de amônio, que correspondem à 29,10 mM e 60,00 mM de nitrogênio (Tabela 3).

O Clone 800X sem BAP também se comportou conforme curva quadrática.

Esses resultados concordam com Schiva, Lercari e Giusta (1982) que, testando cultivares comerciais, constataram diferentes respostas à níveis de citocininas mostrando alta herdabilidade. O Clone II apresentou em média 24% de hiperhidricidade *in vitro*, o Clone III apresentou 54%, enquanto o Clone 800X apesar de não apresentar vitrificação é extremamente sensível à concentração de nitrogênio mostrando sinais de toxidez; à partir de 3/4 de NH_4NO_3 as plântulas começam à apresentar pintas pretas provavelmente causada pela concentração de N ser alta para esse clone. Conforme Daguim e Letouzé (1985), a vitrificação ou hiperhidricidade é diretamente associada à níveis de nitrato de amônio no meio de cultura. Em cravos Cuzzuol, Gallo e Crocomo (1993), mostraram que à 0,0 mM de NH_4NO_3 reduziu a taxa de vitrificação para 10%.

Dessa maneira, os resultados concordam, pois a melhor dosagem de nitrato de amônio com BAP para o Clone III foi menor (29,10 mM de nitrogênio) que para o Clone II (39,40 mM de N) e a que apresenta vitrificação bem menor que o Clone III. O Clone 800X, apesar de não apresentar vitrificação é mais sensível no entanto que os demais pois a melhor dosagem em termos de número de folha foi inferior (23,95 mM) de nitrogênio (23,95 mM de nitrogênio).

2.4 CONCLUSÕES

- Houve diferenças de resposta quanto ao número de brotações entre os genótipos.
- A concentração de 60 mM de N inibe a regeneração de brotos; enquanto a melhor concentração de nitrogênio na indução de brotações para o Clone II foi 39,40 mM, 29,10 mM para o Clone III e a 23,95 mM para o Clone 800X, sendo a relação NO_3/NH_4 de 2,82; 4,65; 8,31 respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-QAoud, H.; SHIRVIN, R.M.; BELOW, F.E. Influence of nitrogen form and NH_4^+ - N/NO_3^- - N ratios on adventitious shoot formation from pear (*Pyrus communis*) leaf explants *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.30, p.135-140, 1992.
- AHMIN, M.; VIETH, J. Production de plantas haploides de *Gerbera jamesonii* par culture "in vitro" d'ovules. **Canadian Journal of Botani**, Ottawa, v.64, n.10, p.2355-2357, 1986.
- AMMIRATO, P.V. Patterns of development in culture. In: HENKE, R.R.; HUGHES, K.W.; CONSTANTIN, M.J.; HOLLAENDER, A. eds **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum Press, 1985. p.9-29.
- ARELLO, E.F. Aspectos gerais do comportamento "in vitro" de *Kielmeyera coriacea* Martins (Guttiferae): Produção e enraizamento de brotações. ESAL: Lavras, 1991. 148p. (Tese - Mestrado em Fitotecnia).
- BARBOSA, M.H.P. Propagação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook através de capítulos jovens. ESAL: Lavras, 1991. 48p. (Tese - Mestrado em Fitotecnia)
- BESPALHOK, J.C.B.F.; VIEIRA, L.G.E.; HASHIMOTO, J.M. Fatores influenciando a micropropagação *in vitro* de gemas auxiliares de *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertonil. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 4, n.1, p.59-61, 1992.
- BLAKESLEY, D.; LENTON, J.R.; HORGANT, R. Benzyladenine ribosylglycoside: a metabolite of benziladenine in *Gerbera jamesonii*. **Phytochemistry**, London, v.30, n.2, p.387-388, 1991.

- BORNMAN, C.H.; VOGELMANN, T.C. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine - induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.61, p.505-512, 1984.
- CAO, W.; TIBBITTS, T.W. NH_4/NO_3 . Mixtures enhance growth in potatoes. **HortScience**, Alexandria, v.27, n.6, p.177, 1992.
- CUZZUOL, G.R.F.; GALLO, L.A.; CROCOMO, O.J. Nitrogênio, Cálcio e atividade da Peroxidase na vitrificação do Cravo (*Dianthus Cary phyllus*) *in vitro*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, Brasília: EMBRAPA, 1993. **Programas e Resumos...** Brasília, 1993.
- DAGUIM, F.; LETOUZÉ, R. Ammonium - induced vitrification in cultured tissues. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.66, p.94-98, 1986.
- DA GUIM, F.; LETOUZÉ, R. Relations entre hypolignification et état vitreuse chez *Salix babylonica* in culture *in vitro*. Rôle de la nutrition ammoniacale. **Journal Canadien de Botanique**, Ottawa, v.63, n.22, p.324-326, 1985.
- DEBERGH, P.; AITKEN-CHRISTIE, I.; COHEN, D.; GROUT, B. VON ARNOLDS, S.; ZIMMERMAN, R.; ZIV, M. Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.30, p.135-140, 1992.
- DO, C.B.; CORMIER, F. Effects of high ammonium concentrations on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension cultured in a production medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.27, p.169-174, 1991.
- ESASHI, T.; LEOPOLD, A.C. Cotyledon expansion as a bioassay for cytokinins. **Plant Physiology**, Washington, v.44, n.4, p.618-620, Apr. 1969.
- EVANS, H.I.; SORGER, G.J. Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v.17, p.47-76. 1966.
- FASOLO, F.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.16, p.75-87, 1989.
- GEIER, T. Factors affecting plant regenerations from leaf segments of *Anthyrium scherzerianum* Shoot (ARaceae) Culture *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.6, p.115-125, 1986.
- GERTSSON, O.E. Influence of macronutrient composition, TIBA, and dark treatment on shoot formation and nitrogen content in petiole explants of senecio x hybrido. **Journal of Horticultural Science**, London, v.63, p.497-502, 1988.

- GREGORINI, G.; LORONZI, R.; LANCIONI, G. The propagation of géberas by *in vitro*. Culture of vegetative apices. **Revista de Deila Ortoflorofructicultura Italiana**, Italy, v.60, n.5, p.282-288, 1976.
- GREY, D.; STEPAN-SARKISSIAN, B.; POWCER, M.N. Biochemistry of forest tree species in culture. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. eds. **Cell and Tissue Culture in Forestry**, Dordredt, v.2, p.31-60, 1987.
- HEDTRICH, C.M. Production of shoots from leaves and production of *Gerbera jamesonii*. **Gartenbauwissenschaft Weihenstephan**, Berlin, v.44, n.1, p.1-3, 1979.
- HEWITT, E.J. A perspective on mineral nutrition. In: ROBB, D.A.; PIERPOINT, W.S. (eds.). **Metal and micronutrients uptasce and utilization by plants**. New York: Academic Press, 1983. p.277-323.
- HUANG, J.M.; NI, Y.Y.; LIN, M.M. The micropropagation of gerbera. **Acta Horticultural Sinica**, Skierniewice, v.14, n.2, p.125-128, 1987.
- KEVERS, C.; COUMANS, M.; COUMANS-GILLES, M.F.; GASPAR, T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.61, p.69-74, 1984.
- KRIKORIAN, D. Cloning higher plants from asseptical cultured tissues and cells. **Biological Review**, Vodickova, v.57, p.151-218, 1982.
- LALIBERTE, S.; CHRETIEN, L.; VIETH, J. In vitro plantlet productions from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. **HortScience**, Alexandria, v.20, n.1, p.137-139, 1985.
- LUTTGE, V.; HIGINBOTHAM, N. **Transport in Plants**. Berlin: Springer-verlag, 1979.
- MAIA, E.; BECK, D.; PIPET, T.A.; BETACHINI, B. *In vitro* clonal propagation if *Gerbera jamesonii* Bolus. **Compts Rendus des Seaces de l'Académic des Sciences**, France, v.296, n.18 p.885-887, 1982.
- MEYNET, J.; SIBI, M. Haploid plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules in *Gerbera jamesonii*. **Zeitschrift fuer Pflanzenzrichtring**. France, n.93, n.1, p.78-85, 1984.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Madison, v.15, p.473-497, 1962.
- NAGAKUBO, T.; NAGASAWA, A.; OLKAWA, H. Micropropagation of garlic through *in vitro* bulblet formation. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.32, p.175-183, 1993.

- NANNETTI, D.C.; SATO, A.Y.; PINTO, J.E.B.P. Efeito de diferentes níveis de nitrogênio e cálcio, combinados com BAP e TDZ no desenvolvimento de *Heliconia* spp. *in vitro*. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA ESAL, 7, Lavras, 1994. **Anais...** Lavras: ESAL, 1994. p.165.
- PAWLOWSKA, H. Trials on gerbera propagation *in vitro*. **Referatitronyi Zhurnal**, Moskva, v.21, n.2, p.177-181, 1977.
- PETRU, F.; MATOUS, J. *In vitro* cultures of gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus). **Zahradnictvi**, Prague, v.11, n.4, p.309-314, 1984.
- PIERIK, R.L.M.; JANSEN, J.L.M.; MAASDAM, A.; BINNENDIJK, C.M. Optimalization of gerbera plantlet production from excised capitulum explants. **Scientia Horticultural**, Amsterdam, v.3, n.4, p.351-357, 1975.
- PIERIK, R.L.M.; STEEGMANS, H.H.N.; VERHAEGH, J.A.M.; WOUTERS, A.N. Effect of cytokinin and cultivar on shoot formation of *Gerbera jamesonii in vitro*. **Netherlands Journal of Agricultural Science**. Wageningen, v.30, n.4, p.341-346, 1982.
- PIERIK, R.L.M.; STEEGMANS, H.H.N.; VERHAEGH, J.A.M.; WOUTERS, A.N.; VEZHEAG, J. New developments in the vegetative propagations of gerberas in testtubes. **Vakblad voor de Bloemisterij**, Wageningen, v.34, n.25, p.36-37, 1979.
- RAATLE, D.V.A. Gerbera breeding and propagation. **Deutscher gartenbau**, v.32, n.42, p.1754-1755, 1978.
- RAYLE, D.L.; ROSS, C.W.; ROBINSON, N. Estimation of osmotic parameter, accompanying zeatin-induced growth of detached cucumber cotyledons. **Plant Physiology**, Washington, v.70, p.1634-1636, 1982.
- REYNOIRD, J.P.; CHRIQUI, D. NOIN, M., BROWN, S.; FRANCERESCO, D.M. Plant regeneration from *in vitro* leaf culture of several *Gerbera* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Netherlands, v.33, p.203-210, 1993.
- SHIVA, T.; LERCARI, B.; GIUSTA, R. Micropropagation of gerbera: variable response to "in vitro" culture. **Annali dell'Istituto Sperimentale per la Floricoltura**, San Remo, v.13, n.1, p.56-57, 1982.
- SCHUM, A.; BICHLER, I. Rooting and quality of gerbera *in vitro*. **Deutscher Gartenbau**, Berlin, v.40, n.4, p.140-144, 1986.
- SITBON, M. Production of haploid *Gerbera jamesonii* plants by *in vitro* culture of unfertilized ovules. **Agronomie**, Angers, v.1, n.9, p.807-812, 1981.

- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. In: BELL, E. (ed.) **Molecular and Cellular Aspects of Development**, New York: Harper & Row, 1965. p.481-494.
- TEPFER, D.A.; FOSKET, D.E. Hormone-mediated translation control of protein synthesis in cultured cells of *Glycine max*. **Developmental Biology**. New York, v.62, p.486-497, 1978.
- WAINWRIGHT, H.; FLEGMANN, A.W. The micropropagation of *Gooseberry* () in vitro proliferation and in vivo establishment. **Journal of Horticultural Science**, Wageningen, v.60, p.485-491, 1985.
- WELANDER, T. Influence of medium compositions on organ formation in explants of *Begonia x himalis* in vitro. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, v.43, p.136-141, 1979.
- ZENS, A.; ZIMMER, K. In vitro vermehrung ven *Anthurium Scherzerianum*. **Gartenbauwissenschaft Weihenstephan**, Berlin, v.51, p.26-31, 1986.

3 AVALIAÇÃO DE UM NOVO REGULADOR DE CRESCIMENTO E CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO NA MULTIPLICAÇÃO DE GÉRBERA DE VASO

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do thidiazuron na multiplicação de gérbera e sua relação com as dosagens de nitrogênio. O thidiazuron é um desfolhante específico do algodão e recentemente tem sido usado como citocinina. Para tanto realizaram-se três experimentos. Estudou-se para o Clone II, as seguintes concentrações de thidiazuron (0,0; 0,05; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L). Para os Clones III e 800X estudaram-se as dosagens de 0,0; 0,0063; 0,00125; 0,0250; 0,0500; 0,5000 mg/L de TDZ. Fixando a dosagem de 0,05 mg/L de TDZ variaram-se níveis de nitrogênio através das concentrações de nitrato de amônio (18,90; 23,95; 29,10; 39,40; 49,70 e 60,0 mM de N). Para os três clones estudados, a dosagem que favoreceu maior número de brotações foi à 0,05 mg/L de TDZ. Ao variarem-se os níveis de nitrogênio, a melhor combinação foi à 49,70 mM que corresponde à 3/4 de nitrato de amônio da concentração original do MS.

3.1 REFERENCIAL TEÓRICO

O thidiazuron (N - phenil - N - 1,2,3, thidiazol - 5 ylurea) é um desfolhante específico do algodão e foi registrado pela Schering AC (Berlim, Alemanha) em 1976 (Arndt,

Rush e Stillfried, 1979). A indução da queda das folhas parece ser mediada pelo aumento na produção endógena de etileno (Suttle, 1986) que é uma das causas da hiperhidricidade quando usada em doses excessivas.

O TDZ é uma substância derivada da uréia e não contém purina como as citocininas clássicas como a benzilaminopurina, cinetina ou Zeatina (Figura 10).

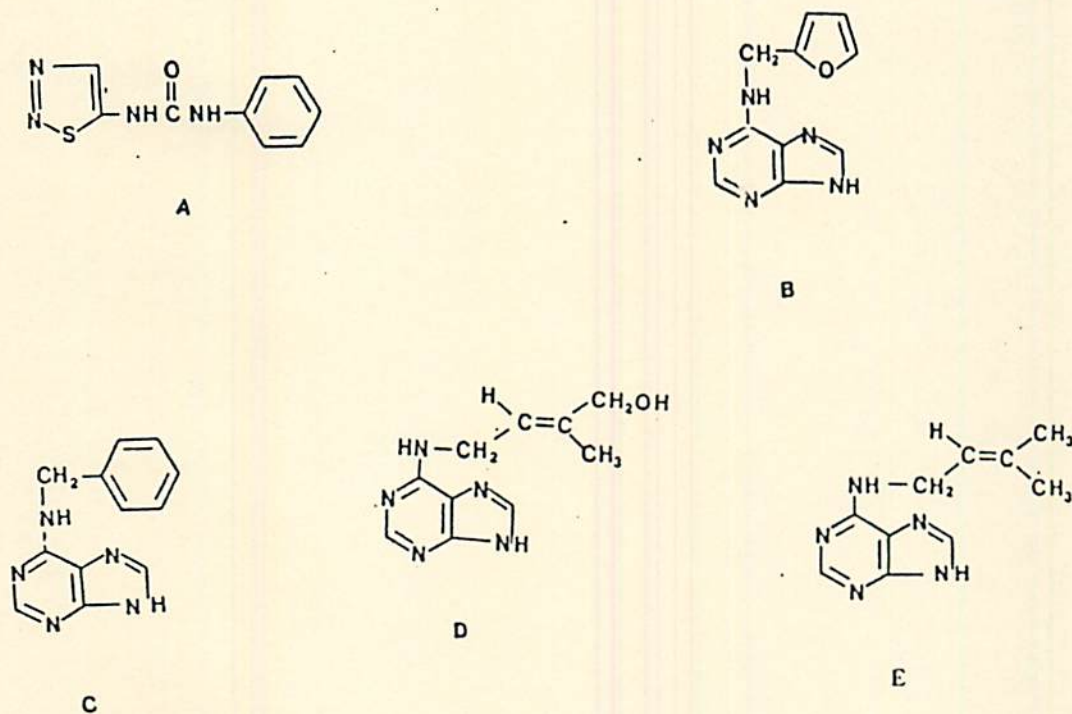


FIGURA 10. Estruturas químicas de (A) Thidiazuron, (B) cinetina, (C) BA, (D) zeatina e (E) 2.i.P. ESAL, Lavras - MG, 1994.

Na década de 1980, a sua atividade como citocinina foi relatada em calos de *Phaseolus lunatus* L. cv Kingston (Mok, Mok e Armstrong, 1982).

Outros estudos mostram que o TDZ é mais ativo biologicamente em baixas concentrações que outras citocininas sintéticas como cinetina e BA, pois são mais resistentes às

oxidases, além de serem mais estáveis, possuindo grande potencial no uso em cultura de tecidos (Mok et al., 1987).

Fellman et al. (1987) estudaram o efeito do TDZ na formação de meristema e multiplicação de gemas de petúnia e azaléia. Quando utilizado em meio de cultura para regeneração de petúnia não obteve resultados promissores por ter usado concentrações altas se relacionarmos a sua alta de TDZ de 10^{-4} a 10^{-8} M.

Em plantas transgênicas a regeneração utilizando BAP ou ANA deixa muito a desejar principalmente em rosas e cravos. O número de gemas, quando se utiliza o TDZ como citocinina é igual ou maior ao das citocininas tipo purinas. Baixas concentrações de TDZ (0,0022 a 0,088 mg/L) são eficientes na micropropagação. A exposição prolongada em meio contendo TDZ pode causar hiperhidricidade (Lu, 1993).

Huettemar et al. (1993) mostraram que o TDZ é extremamente eficaz quando usado em cultivo de muitas espécies florestais recalcitrantes. Concentrações de 10 a 1000 vezes menores são mais eficazes que outros reguladores de crescimento.

Em *Miscanthus sinensis* o TDZ induziu um número significativamente menor quanto a formação de gemas axilares, quando comparadas ao BA na mesma concentração. Quando as gemas são transferidas para o meio de enraizamento, as previamente crescidas no TDZ ficaram mais altas e formaram poucas raízes que as crescidas no BAP (Nielsen, 1993).

Em framboeza o TDZ promoveu maior percentagem de regeneração e mais brotos por explante que o BA, 70% de regeneração foi obtido com 1mg/L de TDZ e 0,5 mg/L de IBA (Cousineau e Donnelly, 1991).

Em pimentão o TDZ nas concentrações iguais ou superiores à 0,15 mg/L promoveram maior percentagem de brotações e no BAP à partir de 4,0 mg/L. Na concentração

de 0,45 mg/L de TDZ o número de brotações foi maior em relação às demais concentrações (Innecco, 1993). Em *Picea glauca* o TDZ induziu a formação de gemas na ausência de outras citocininas endógenas e no meio WPM (Ellis et al., 1991), enquanto que em *Faxinus americana*, o TDZ a 10 μ M estimulou a morfogênese e à 3 μ M o alongamento de brotações de (Bates et al., 1992).

A adição de 0,05 μ M ou 0,5 μ M de TDZ promoveu significativamente a regeneração de folhas maduras mas foi ineficaz para explantes de clones recalcitrantes (Reynold et al., 1993).

Carvalho e Pinto (1993) estudando os níveis de 0,025; 0,250; 0,500 e 1,00 mg/L de TDZ em *Heliconia* obtiveram maior número de brotos à 0,25 mg/L, sendo que para comprimento de brotos a menor dosagem (0,025 mg/L) foi a mais efetiva. A coloração dos brotos segundo Carvalho (1993) se manteve uniforme, mas a conformação destes foi prejudicada com o aumento do nível de TDZ para 0,5 e 1,0 mg/L acarretando formação de brotos de tamanho reduzido com folhas pequenas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Avaliação do TDZ entre 0 e 4 mg/L

As concentrações de TDZ testadas foram 0,0; 0,05; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L no meio de cultura básico de MS. O pH foi ajustado para 6,0 e autoclavado à 121°C durante 20 minutos. O clone testado foi o II e as plântulas possuíam duas folhas e mediam 10 mm de comprimento aproximadamente. Foram inoculadas em tubos de ensaio de 20 x 150 mm com com

10 mL de meio de cultura. O delineamento foi o inteiramente casualizado com 4 repetições com 6 plântulas por repetição. As características avaliadas foram: pesos de matérias fresca e seca da parte aérea, número de brotações e folhas e comprimento da parte aérea.

3.2.2 Avaliação do TDZ entre 0 e 0,5 mg/L

Avaliaram-se as seguintes concentrações 0; 0,0063; 0,0125; 0,0250; 0,0500; 0,500 mg/l de TDZ no meio M.S. Os clones testados foram o III e 800X. O delineamento também foi o inteiramente casualizado, para o Clone 800X foram utilizados 4 repetições com 6 plântulas por repetição e para o Clone III 4 repetições com 7 plântulas por repetição. As características avaliadas foram: pesos de matérias fresca e seca, comprimento da parte aérea, número de brotações e folhas.

3.2.3 Avaliação do efeito do nitrogênio com TDZ

O meio básico utilizado foi o MS suplementado com 0,05 mg/L de TDZ e variaram-se as concentrações de nitrato de amônio a 0, 1/8, 1/4, 1/2, 3/4 e 1 da concentração original do MS. O clone testado foi o 800X e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 5 repetições com cinco plântulas por repetição. As características avaliadas foram: pesos de matérias fresca e seca, número de brotações e folhas e comprimento da parte aérea.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Avaliação do TDZ entre 0 e 4 mg/L

Verificou-se efeitos altamente significativos dos tratamentos (níveis de nitrato de amônio) para todas as variáveis analisadas.

3.3.1.1 Peso da matéria fresca e seca da parte aérea do Clone II

Nesta faixa de concentração de TDZ, o ganho de matéria fresca e seca da parte aérea ao Clone II apresentaram-se respostas cúbicas como as observadas na Figura 11.

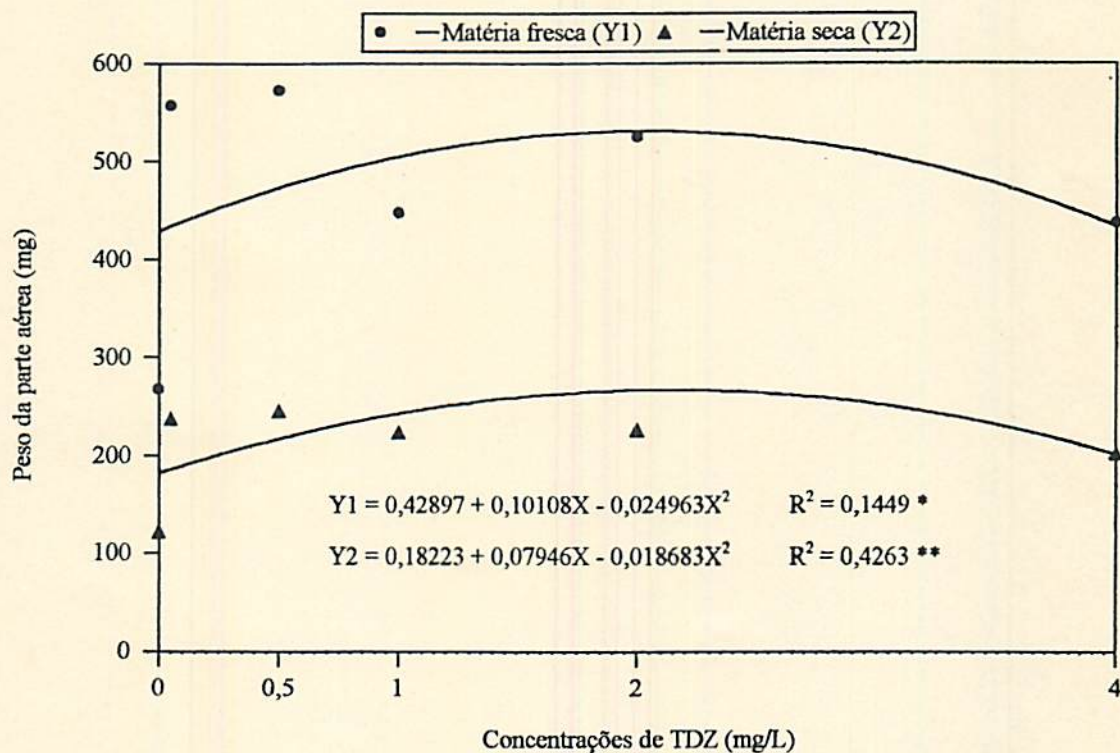


FIGURA 11. Representação gráfica do efeito do TDZ sobre os pesos de matérias fresca e seca de gérbera de vaso Clone II. ESAL, Lavras - MG, 1994.

Os maiores valores de pesos de matérias fresca e seca foram verificadas nas dosagens de 0,5 e 2 mg/L de TDZ sendo que à partir de 0,5 mg/L foi devido à presença de entumescimento na base dos segmentos. A calogênese ocorreu em detrimento do número de brotações indicando uma inibição de regeneração à partir dessa dosagem. Fortes et al. (1993) ao estudarem o Thidiazuron nas dosagens de 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 mg/L na multiplicação *in vitro* do Kiwi constataram que a maior percentagem de matéria seca ocorreu nos tratamentos com baixa concentração de TDZ, devido ao fato que nessas concentrações ocorrerem uma maior área foliar.

Por outro lado Moraes et al. (1993), estudando o TDZ nas dosagens de 0; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 8,00 e 16,00 mg/L constataram que as concentrações de 8,00 e 16,00 mg/L de TDZ foram fitotóxicas, não havendo portanto formação de calos e nem de brotações adventícias. Para o peso da matéria seca mostraram um comportamento quadrático.

Carvalho e Pinto (1993) constataram que o aumento do nível de TDZ para 0,5 e 1,0 mg/L prejudicou a formação dos brotos de *Heliconia* spp.

3.3.1.2 Número de brotações do Clone II

Esta característica apresentou comportamento segundo uma curva quadrática onde o máximo de brotos/explante correspondeu à dosagem de 0,05 mg/L de TDZ. Conforme aumentou-se a concentração houve uma inibição da regeneração de brotos e ocorreu uma indução de calos (Figura 12).

Na maior dosagem 4 mg/L obteve-se 1,92 brotos/explante, porém na base do segmento nodal foi observado a formação de calos e as brotações foram de tamanho reduzido e deformadas (Figura 14).

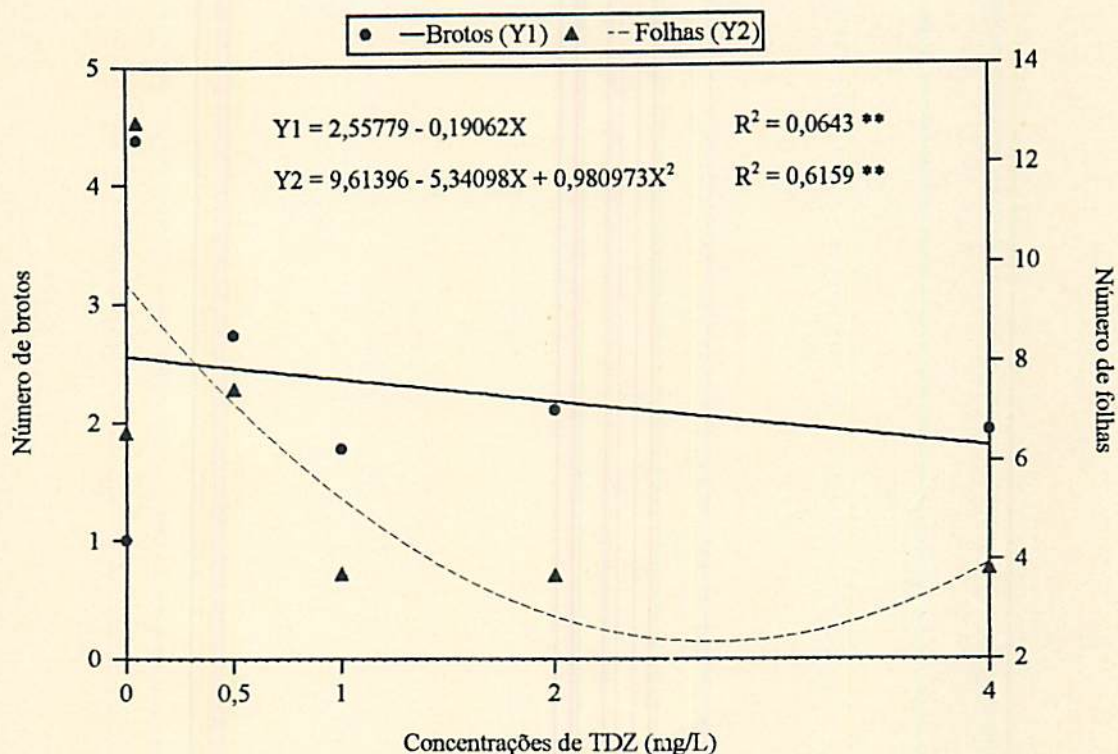


FIGURA 12. Representação gráfica do efeito do TDZ sobre o número de brotações e número de folhas de gérbera de vaso Clone II. ESAL, Lavras - MG, 1994.

De acordo com o que se observa na literatura, os resultados com TDZ são muito contrastantes, como os observados em kiwi por Moraes et al. (1993), onde não houve nem mesmo formação de calos na faixa de concentração entre 8 a 16 mg/L. Em rosa, Lu (1993), verificou que concentrações de 0,22 a 0,88 mg/L são eficientes na indução de brotações.

3.3.1.3 Número de folhas do Clone II

O maior número de folhas coincide com o maior número de brotos, à 0,05 mg/L de TDZ (Figura 12). À partir desse valor houve também diminuição do número de folhas, com os dados se comportando de forma quadrática.

Segundo Fortes et al. (1993) ocorreu maior número de brotações nas maiores concentrações porém com diminuição de área foliar. Neste aspecto de área foliar pode-se dizer que os resultados obtidos neste experimento evidenciaram que a diminuição também a área foliar foi em decorrência da redução do número de folhas.

Segundo Huetteman e Preece (1993) altas concentrações podem estimular a formação de calos, isto foi observado com gérbera, que à partir de 0,5 mg/L já iniciou-se a indução de calos com a inibição da regeneração de brotos e folhas.

3.3.1.4 Comprimento da parte aérea do Clone II

A medida que aumentou-se as dosagens do regulador de crescimento o comprimento da parte aérea diminuiu em função da indução de calos e à inibição do crescimento da plântula (Figura 13).

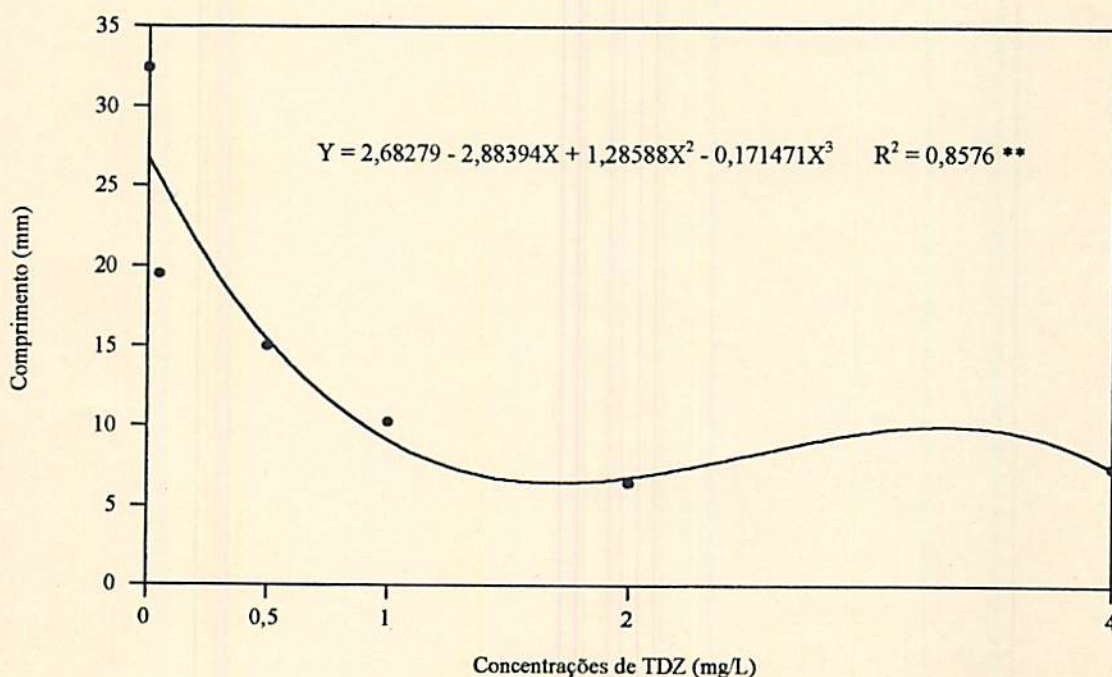


FIGURA 13. Representação gráfica do comprimento da parte aérea de gérbera de vaso Clone II em função das concentrações de TDZ. ESAL, Lavras - MG, 1994.

Na literatura há citações onde o thidiazuron induz a formação de muitos brotos in vitro, porém curtos em várias espécies lenhosas, incluindo *Hibiscus rosa-sinensis* (Preece et al., 1987), maçã (Gala) (Van Niewkert, Zimmerman e Fordham, 1986), videira (Gray e Bentos, 1991). Os resultados encontrados com Gérbera neste trabalho, mostram que o número de brotações induzidos por aumentos nas concentrações de TDZ promovem decréscimos no alongamento de brotações. Este resultado é confirmado pelo trabalho de Pijut, Michler e Voelker (1991) trabalhando com *Pinus strobus* L.).

Observa-se pelos resultados que o maior comprimento foi à 0 mg/L de TDZ. Embora Bates et al. (1992) cita que em *Fraxinus americana* L. o TDZ estimulou o alongamento de gemas à 30 mM.

Carvalho e Pinto (1993) também constataram que a menor dosagem de TDZ (0,025 mg/L) proporcionou o maior comprimento em *Heliconia* spp., enquanto para 0,05 e 1,0 mg/L de TDZ acarretou formação de brotos de tamanho reduzido com folhas pequenas.

3.3.2 Avaliação de TDZ entre 0 e 0,5 mg/L

Para o Clone 800X os pesos das matérias fresca e seca se comportaram também segundo uma curva cúbica onde os máximos foram à 0,0125 mg/L e 0,05 e 0,5 mg/L de TDZ.

Para o Clone III, a matéria fresca pode ser descrita segundo uma curva quadrática onde o ponto máximo foi obtido com 0,05 mg/L de TDZ e quanto a matéria seca, se comportou segundo uma curva cúbica onde os máximos foram à 0,0125 mg/L e 0,05 e 0,5 mg/L de TDZ. Para estes dois clones à 0,05 e 0,5 mg/L de TDZ os valores foram superiores (Tabela 4). À 0,05 mg/L houve grande número de brotações sem calos. Foi observado no entanto, formação de calos e indícios de fitotoxidez à partir de 0,5 mg/L (Figura 14).

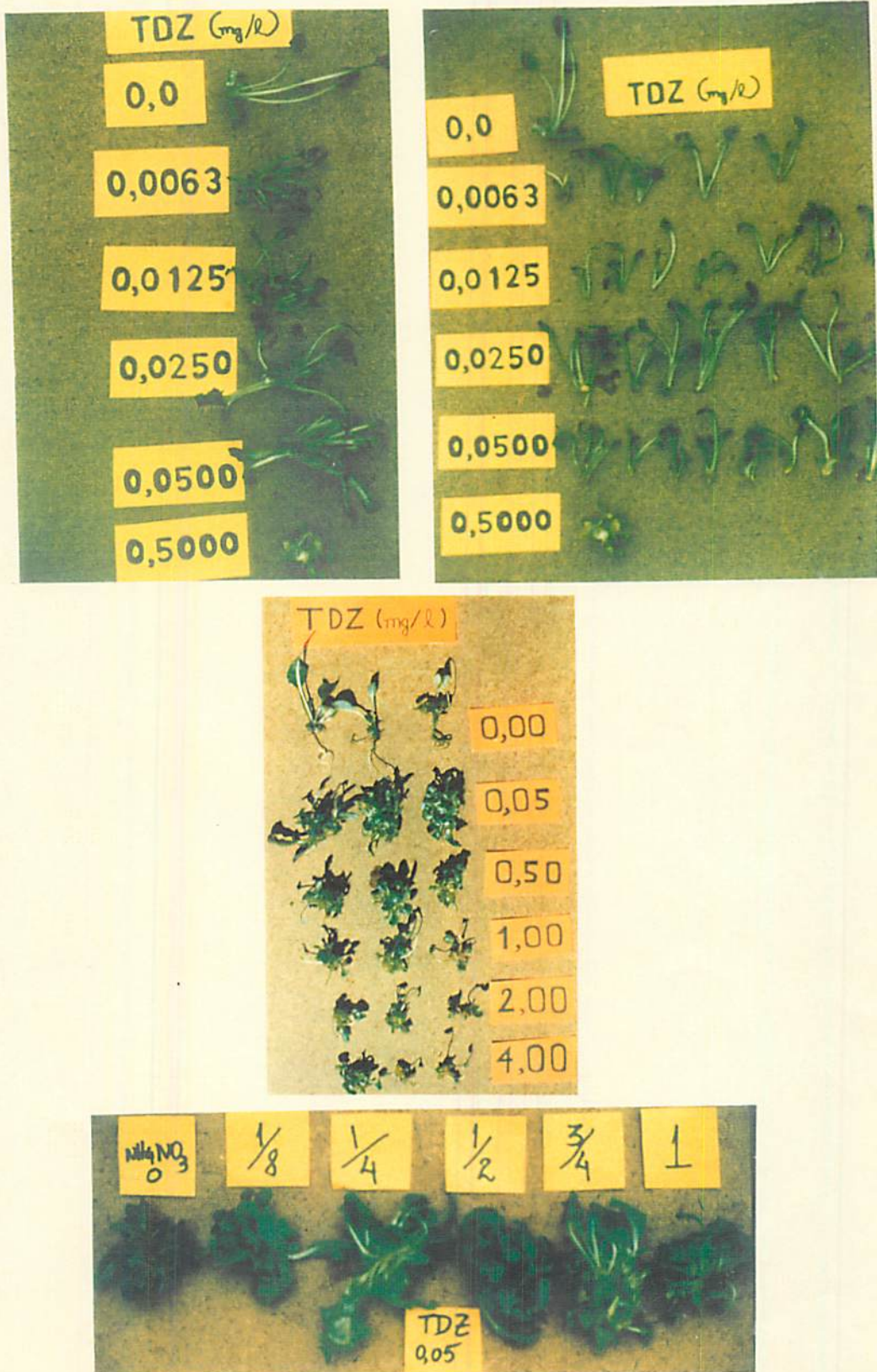


FIGURA 14. Fotografia ilustrativa do experimento com TDZ em gérbera de vaso Clone 800X. ESAL. Lavras - MG, 1994.

Quanto ao comprimento das brotações o Clone 800X comportou-se segundo uma reta linear obedecendo uma relação inversamente proporcional entre aumento da concentração e redução do comprimento. O Clone III comportou-se segundo uma curva quadrática atingindo o máximo à 0,0250 mg/L de TDZ (Tabela 4).

TABELA 4. Valores médios dos pesos das matérias fresca e seca, comprimento da parte aérea, número de brotações e folhas de gerbera de vaso em função das concentrações de TDZ, para os Clones III e 800X. ESAL, Lavras - MG, 1994.

TDZ (mg/L)	Mat. fresca (mg)		Mat. seca (mg)		Comprim. (mm)		Nº brotações		Nº folhas	
	Clone III	800X	Clone III	800X	Clone III	800X	Clone III	800X	Clone III	800X
0,000	633,0	263,0	32,0	15,0	41,0	29,6	1,92	1,00	9,4	7,6
0,0063	895,0	521,0	42,0	27,0	34,2	19,1	3,10	3,67	11,8	21,7
0,0125	977,0	586,0	45,0	34,0	36,0	18,9	3,42	4,28	11,0	25,2
0,050	1410,0	701,0	51,0	34,0	44,0	16,2	4,17	4,60	15,0	29,1
0,5	1035,0	634,0	52,0	41,0	13,4	10,0	1,91	1,36	1,2	2,0
Média Geral	987,0	543,2	42,0	28,8	36,6	18,8	2,87	3,75	9,4	22,8
CV (%)	24	10	16	15	8	11	17	13	26	13

MF _{Y_{III}} = 633 + 14,9139953X - 28,55709771X ²	r ² = 90%
Y _{800X} = 263 + 12,544771X - 132,75443154X ² + 218,167801348X ³	r ² = 54%
MS _{Y_{III}} = 32 - 0,3195184X + 11,60570373X ² - 21,831362408X ³	r ² = 50%
Y _{800X} = 15 + 0,009841311X - 15,35007944X ² + 26,885438221X ³	r ² = 71%
Comp. Y _{III} = 41 + 20,2513641X - 50,222654061X ²	r ² = 84%
Y _{800X} = 29,6 - 0,8156775X	r ² = 59%
Nº Brotações Y _{III} = 2,2426020 + 36,5335305X - 75,11116915X ²	r ² = 70%
Y _{800X} = 2,555850 + 58,1109077X - 107,96128448X ²	r ² = 64%
Nº folhas Y _{800X} = 15,385262 + 352,5337411X - 650,10855622X ²	r ² = 79%
Y _{III} = -9,487523 + 87,1788273X - 207,10654492X ²	r ² = 51%

Para número de brotações, os Clones 800X e III se comportaram segundo uma curva quadrática onde o maior número de brotações alcançados para ambos foi à 0,050 mg/L embora a 0,5 mg/L observou-se início de formação de calos e indícios de toxidez para ambos os clones (Tabela 4).

O número de folhas para ambos os clones comportou-se segundo uma curva quadrática onde os máximos também foram à 0,050 mg/L para o Clone 800X com 29,14 folhas e o máximo foi à 0,05 mg/L para o clone com 15,05 folhas.

Paranhos, Echart e Franco (1993) testando duas concentrações de Thidiazuron à 0,10 e 0,25 mg/L observaram maior eficiência na formação de brotos em begônia na menor concentração. Os melhores resultados observado neste trabalho em termos de número de brotos, folhas e incremento de biomassa foi de 2 a 5 vezes menor em relação a concentração do TDZ encontrado com begônia.

Carvalho e Pinto (1993), testando as concentrações de 0,025; 0,250; 0,50 e 1,00 mg/L de TDZ constatou em Helicônia que concentrações de 0,5 e 1,0 mg/L, foram prejudiciais.

De acordo com o que se observou na literatura concentrações baixas de TDZ são mais eficazes na indução de brotações, resultados esses semelhantes aos encontrados neste estudo.

3.3.3 Efeito do nitrogênio com TDZ na multiplicação

3.3.3.1 Peso das matérias fresca e seca do Clone 800X

Estatisticamente o menor ganho de matéria fresca e seca foi à 0 mM de nitrogênio e os maiores ganhos foram à 39,40 e 49,70 mM de N que correspondem à 1/2 e 3/4 de nitrato de amônio do MS (Tabela 5).

Esses resultados concordam com Han e Stephens (1992) que constataram que concentrações abaixo de 30 mM de nitrogênio causam deficiência em *Impatiens platypetala* Lindl, já que o nitrogênio é o principal constituinte de proteínas estruturais e enzimáticas, e sua carência provocaria baixo incremento de biomassa.

TABELA 5. Valores médios dos pesos de matérias fresca e seca, número de brotações e folhas e comprimento de gérbera de vaso Clone 800X em função das concentrações de nitrato de amônio com 0,05 mg/L de TDZ. ESAL, Lavras - MG, 1994.

NH ₄ NO ₃ (mM)	(Rela- tivo) (MS)	N total (Mm)	M. fresca (mg)	M. Seca (mg)	Nº de brotações	Nº de folhas	Comprimento (mm)
0	= (0)	18,80	755,0	31,6	4,96	34,28	19,4
2,57	= (1/8)	23,95	1454,0	50,5	5,48	36,90	28,0
10,30	= (1/2)	39,40	1827,0	60,6	5,80	43,60	24,8
15,45	= (3/4)	49,70	1785,0	54,7	7,12	54,16	22,4
20,60	= (1/1)	60,00	1641,0	45,7	5,08	44,13	25,8
CV (%)			24	17	18	16	10

3.3.3.2 Número de brotações do Clone 800X

Embora o nitrogênio tenha desempenhado um papel relevante no aumento da taxa de multiplicação de gérbera de vaso, como ocorreu a 49,7 mM e uma relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ de 2,21, o aumento da concentração de N a partir deste valor levou a uma queda sensível quanto ao número de brotos adventícios.

Para esse mesmo Clone 800X quando se utilizou 2 mg/L BAP variando-se as concentrações de nitrogênio o melhor resultado foi com 23,95 mM de nitrogênio, à uma relação 8,31 de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, o qual forneceu uma média máxima de 45,20 folhas. Nesse experimento utilizando-se 0,05 mg/L de TDZ o melhor nível de nitrogênio foi de 4,90 mM com uma relação de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de 2,21.

A relação de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ é importante pois quanto menor a relação, ou seja maior ions NH_4^+ as plantas absorvem esse ion mais rapidamente que o NO_3^- provocando anormalidades conforme já mencionado no presente trabalho.

Han e Stephens (1992) observou que 60 mM de nitrogênio provocou anormalidades em plântulas de *Impatiens platypetala* confirmando mais uma vez que a concentração do nitrogênio do MS pode ser fitotóxica. Resultados estes coincidente com o obtido neste trabalho, pois na dosagem com 60 mM de nitrogênio o número de brotações 5,08 foi próxima à menor dosagem 18,8 mM que forneceu 4,96 brotos (Tabela 5).

3.3.3.3 Número de folhas do Clone 800X

A concentração de 49,70 mM e nitrogênio total favoreceu a formação de um maior número de folhas (54,16), e a partir desse valor houve uma queda sensível no número de folhas. Esta diminuição está relacionada à toxidez causada por altas concentrações de nitrogênio observada também por Bespalhok et al. (1992) em brotos de *Stévia* quando inoculadas nos níveis de 49,70 e 60 mM de nitrogênio.

3.3.3.4 Comprimento da parte aérea do Clone 800X

A concentração de nitrogênio afetou o desenvolvimento da parte aérea (Tabela 5). O maior comprimento foi alcançado com 29,10 mM de nitrogênio, após esta dosagem foi decrescendo em comprimento e ganhando em número de brotações.

Arelló (1991) cita que o BAP à 5,0 mg/L para *Kielmeyera Coriacea* foi interessante para produção de novas brotações, porém deletérios para a qualidade diminuindo o comprimento das plântulas.

Neste caso a associação do nitrogênio ao TDZ favoreceu à 49,70 mM de nitrogênio um maior número de brotações porém com comprimento prejudicado.

3.4 CONCLUSÕES

A melhor dosagem de TDZ para regeneração de brotos adventícios para os Clones II, III e 800X foi 0,05 mg/L.

O melhor nível de Nitrogênio que proporcionou maior número de brotações foi à 49,70 mM que corresponde a 3/4 de nitrato de amônio e a uma relação de 2,21 de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARELLO, E.F. Aspectos gerais do comportamento "in vitro" de *Kielmeyera coriacea* Martius (Guttiferal). Produção e enraizamento de brotações. Lavras: ESAL, 1991. 148p. (Tese - Mestrado em Fitotecnia).
- ARNDT, F.; RUSH, R.; STILLFRIED, H.V. SN49537 a new cotton defoliant. *Plant Physiology*, Washington, v.57, p.599, 1979.
- BATES, S.; PREECE, J.G.; NAVARRETE, N.E.; SAMBEER, J.W.V.; GAFFNEY, G.R. Thidiazuron stimulates shoot organogenesis and somatic embryogenesis in whiteash (*Fraxinus americana* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ culture*. Netherlands, v.31, p.21-29, 1992.
- BARBOSA, M.H.P. Propagação in vitro de *gerbera jamesonii* Bolus ex Hook através de capítulos jovens. Lavras: ESAL, 1991. 48p. (Tese - Mestrado em Fitotecnia).
- BESPALHOK, J.C.B.F.; VIEIRA, L.G.E.; HASHIMOTO, J.M. Fatores influenciando a micropropagação in vitro de gemas axilares de *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertonil. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v.4, n.1, p.59-61, 1992.
- CARVALHO, D.G.; PINTO, I.E.B.P. Multiplicação de *Heliconia* spp. "In vitro" através do uso de TDZ e BAP. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, Brasília, 1993. Resumos... Brasília: EMBRAPA, 1993. p.152.
- COUSINEAU, J.C.; DONNELLY D.J. Adventitious shoot regeneration from leaf in plants of tissue cultured and greenhouse-grown raspberry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v.27, p.249-255, 1991.

- ELLIS, D.D.; BARCZYNSHA, H.; McCown, B.H.; NELSON, N. **Plant Cell, Tissue and organ culture**, Netherlands, v.27, p.281-287, 1991.
- FORTES, G.R.L.; LEITE, D.L.; OLIVEIRA, R.J.P. Influência da localização da retirada do explante foliar e da escarificação na calogênese e organogênese do kiwi (*Actinidia deliciosa*). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, Brasília, 1993. **Resumos...** Brasília: EMBRAPA, 1993. p.114.
- GRAY, D.J.; BENTON, C.M. In vitro micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.27, p.7-14, 1991.
- HAN, K.; STEPHENS, L.C. Carbohydrate and nitrogen sources affect respectively *in vitro* germination of immature ovules and early seedling growth of *Impatiens platypetala* Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.31, p.211-214, 1992.
- HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron a potent cytokini for woody plant tissue culture. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.33, p.105-119, 1993.
- INECCO, R. **Propagação vegetativa de Pimentão *Capsicum annum* L. através de métodos "in vitro" e estacas**. Lavras: ESAL, 1993. 105p. (Tese - Mestrado em Fitotecnia)
- KERNS, H.R.; MEYER, M.M. In: "In vitro" propagation of redsilver hybrid maples. **HortScience**, Alexandria, v.20, p.593, 1985.
- LU, C.Y. The use of Thidiazuron in Tissue Culture. **In Vitro Cell Development Biology**, New York, v.29, p.92-96, 1993.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; ARMSTRONG, G.D.J. Cytokinin activity of N-phenyl-N-1,2,3-thiadiazol - 5 - Gl urea (Thidiazuron). **Phytochemistry**, London, v.21, p.1509-1511, 1982.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.G.; MUJER, C.V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenyurea derivatives in Tissue Culture Systems, **HortScience**, Alexandria, v.22, n.6, p.1194-1197, 1987.
- MORAES, E.C.; NUNES, A.M.; MONK, P.; FORTES, G. R. de L.; SANTOS, B.G.F. Obtenção de calos e brotações adventícias em tecido somático de Kiwi suplementado com Thidiazuron. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.5, n.1, p.101. 1993.
- NIELSEN, J.M.; BRANDI, K.; HANSEN, J. Long-term effect of thidiazuron ari intermediate between benzyladenine, Kinetin or isopentnyladenine in *Miscanthus sinensis*. **Plant cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.35, p.173-179, 1993.

- PARANHOS, J.I.; ECHART, C.L.; FRANCO, E.I.H. Avaliação do Thidiazuron na indução de brotações aérea in vitro de *Begonia rieger*. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, Brasília, 1993. **Resumos...** Brasília: EMBRAPA, 1993. p.204.
- PIERIK, R.L.M.; JANSEN, J.L.M.; MAASDAM, A.; BINNENDIJK, C.M. Optimization of gébera plantlet production from excid capitulum explants. **Scientia Horticultural**, Amsterdam, v.3, n.4, p.351-357, 1975.
- PIJUT, P.M.; MICHLER, C.H.; VOELKER, T.M. Effects of embryo expant orientation, thidiazuron, and agar on eastern white pine (*Pinus strobus* L.) Adventitious shoot initiation. **Proceeding. International Symposium on Applications of Biotechnonology to tree culture, Protection and utilization**. Columbus 1991. p.126. (Abstracts).
- PREECE, I.E.; HUETTEMAN, C.A.; PUELLO, C.H.; NEWMAN, M.C. The influence of thidiazuron on in vitro culture of woody plants. **HortScience**, Alexandria, v.22, p.1071, 1987. (Abstracts).
- REYNOIRD, J.D.; CHRQUI, D. NOIN, M.; BROWN, S.; MARIE, D. Plant regeneration from *in vitro* leaf culture of several *Gerbera* species. **Plant cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands v.33, p. 203-210, 1993.
- SUTTLE, J.C. Involvement of ethylene in the action of the cotton de foliant thidiazuron. **Plant Physiology**, Washington v.78, p.272-276, 1986.
- THOMAS, J.C.; KATTERMAN. Cytokinin activity induced by thidiazuron. **Plant Physiology**, Washington v.81, p.681-683, 1986.
- VAN NIEWKERK, P.J., ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation in vitro. **HortScience**, Alexandria, v.21, p.516-518. 1986.

4 EFEITO DO FILTRO AMARELO NO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE GÉRBERA DE VASO *IN VITRO*

RESUMO

Estudou-se o efeito do filtro amarelo no desenvolvimento de plântulas em três Clones II, III e 800X. O meio de cultura básico utilizado foi o MS, suplementado com 2 mg/L de BAP. As características avaliadas foram peso da matéria fresca e seca, comprimento, porcentagem de vitrificação e análise foliar. As plântulas sob o filtro amarelo tiveram maior comprimento, enquanto a porcentagem de vitrificação foi menor.

O Clone 800X sob este filtro mostrou-se com sintomas de toxidez, folhas amarelas com pintas pretas. Procedida a análise mineral das plântulas sob o filtro amarelo, verificaram que continham maior concentração de nutrientes em relação às do controle, com destaque ao nitrogênio e ferro. Isso mostra que o filtro não permitiu a fotoxidação dos sais de nitrato e FeEDTA tornando-se assim sua concentração tóxica em relação ao meio destituído do filtro.

4.1 REFERENCIAL TEÓRICO

A luz é um dos fatores físicos importantes no desenvolvimento das plantas, onde sua qualidade, quantidade e intensidade afetam diretamente esse desenvolvimento. Potter e Rood

(1993) constataram que diminuindo a intensidade da luz houve redução das folhas, raízes, peso de matéria seca, número de folhas e área foliar de *Brassica napus* e em canola ocorreu o inverso. Rood, Zanewich e Pearce (1993) observaram o fotocontrole do metabolismo de giberelina em *Brassica* resultados semelhantes Van der Berg, Davils e Ewing (19..) observaram em gemas de batata. Quanto a qualidade, Eskins e Felker (1993) ao testar sementes de milho *in vitro* sob luz vermelha e azul constataram que a qualidade da luz afeta diretamente o desenvolvimento do embrião e endosperma.

Quando uma planta é exposta à luz a folha responde com produção de clorofila e conversão do precursor do plastídeo (etioplasto) em cloroplastos fotossinteticamente ativos. A luz é absorvida pelas plantas na faixa de 450 nm a 730 nm (Taiz, 1991).

A luz também influencia a transcrição do mRNA da Nitrato Redutase (Kaiser e Brendle-Behnisch, 1991; Tobin Silverhorne, 1985).

Na micropropagação, altas intensidades de luz inibem o enraizamento (Herman, 1991).

Altas irradiações são prejudiciais não só no enraizamento mas na cultura de tecido em geral, onde requer uma irradiância de 35-70 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ enquanto no campo a irradiância é de 140-320 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Isto se deve ao fato da fotossíntese *in vitro* ser limitada, porquanto plantas nessas condições são consideradas heterotróficas (Pierik, 1987).

A radiação ultravioleta é dividida em três classes UVC, (espectro até 280 nm), (280-320 nm) e UVA - (320-390 nm). Apenas a UVB e UVA ultrapassam a camada de Ozone (Stapleton, 1992). Ao bloquear a luz abaixo de 450 nm com filtro amarelo pode-se prevenir mudanças fotoquímicas do meio (Hangarter e Stasinopoulos 1991a; Stasinopoulos e Hangarter, 1990).

Estudando calos de *Lycopersicon esculentum* L, *Daucus carota* L. e *Arabidopsis Thaliana* L. Hangarte e Stasinopoulos (1991b) concluíram que a redução no crescimento causado pela luz branca não filtrada pode ser atribuída primariamente mais por alterações fotoquímicas no meio de cultura do que por funções fotosensoriais do tecido de plantas.

A luz oriunda de lâmpadas fluorescentes (luz branca) pode induzir a produção de formaldeído e deficiência de ferro nas plantas de cultura de tecidos. O formaldeído é produzido pelo EDTA quando este é oxidado pela redução fotoquímica do ferro e podendo ser acumulado em níveis inibidores. O meio se torna deficiente em ferro porque este se torna desquelatado e precipita (Hangarter e Stasinopoulos, 1991a).

A absorção de luz pelo meio de livre de hormônio fica entre 220 a 450 nm. Nenhuma absorção de luz foi detectada entre 450-700 nm. Esta absorção de luz pelo meio é alta para FeEDTA e sais de nitrato. O filtro amarelo bloqueia a faixa de 290-450 nm. O AIA absorve luz à 300 nm e sofre degradação. Essa degradação pode ser prevenida com o uso de containers feitos de polypropyleno que boqueia a luz dessa faixa para baixo.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Testou-se os Clones II, III e 800X. As plântulas foram inoculadas em meio MS contendo 2 mg/L de BAP, e uma parte colocada sob o filtro amarelo de acrílico com 3 mm de espessura. As laterais e a face inferior foram vedadas com papel branco e a outra parte sem o filtro. O material ficou nessas condições durante 30 dias. O Clone 800X foi inoculado em tubo de ensaio 20 x 150 mm e os Clones II e III em frascos 65 x 125 mm.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em que o Clone 800X apresentou com 10 repetições contendo 3 plântulas por repetição, Clone II com 11 repetições e 5 plântulas por repetição e o Clone III com 12 repetições contendo 5 plântulas por repetição.

Após o período de 30 dias o material foi avaliado, para as seguintes características: peso de matéria fresca e seca, comprimento, porcentagem de vitrificação e análise mineral. A avaliação do peso de matéria fresca foi feita em balança de precisão. O peso de matéria seca foi feita após secagem em estufa durante 3 dias à 70°C, sendo pesado em seguida em balança de precisão (Mettler AE-100). A análise foliar foi feita com amostras de 0,5 g de cada tratamento, que após a secagem e pesagem foram trituradas e homogeneizadas para se fazer a amostragem.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença do filtro amarelo não influenciou a produção de matéria fresca e seca (Tabela 6), porém o comprimento das plântulas do Clone II foi maior na presença do filtro (Figura 15).

TABELA 6. Valores médios dos pesos das matérias fresca e seca de gébera de vaso, Clones II e 800X, em função da presença e ausência do filtro amarelo. ESAL, Lavras - MG, 1994.

	Peso matéria fresca		Peso matéria seca	
	Clone II (mg)	Clone 800X	Clone II (mg)	Clone 800X
Sem filtro	4070 a	2753 a	197 a	63 a
Com filtro	3757 a	2952 a	209 a	73 a

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 1% de significância pelo teste de Tukey.

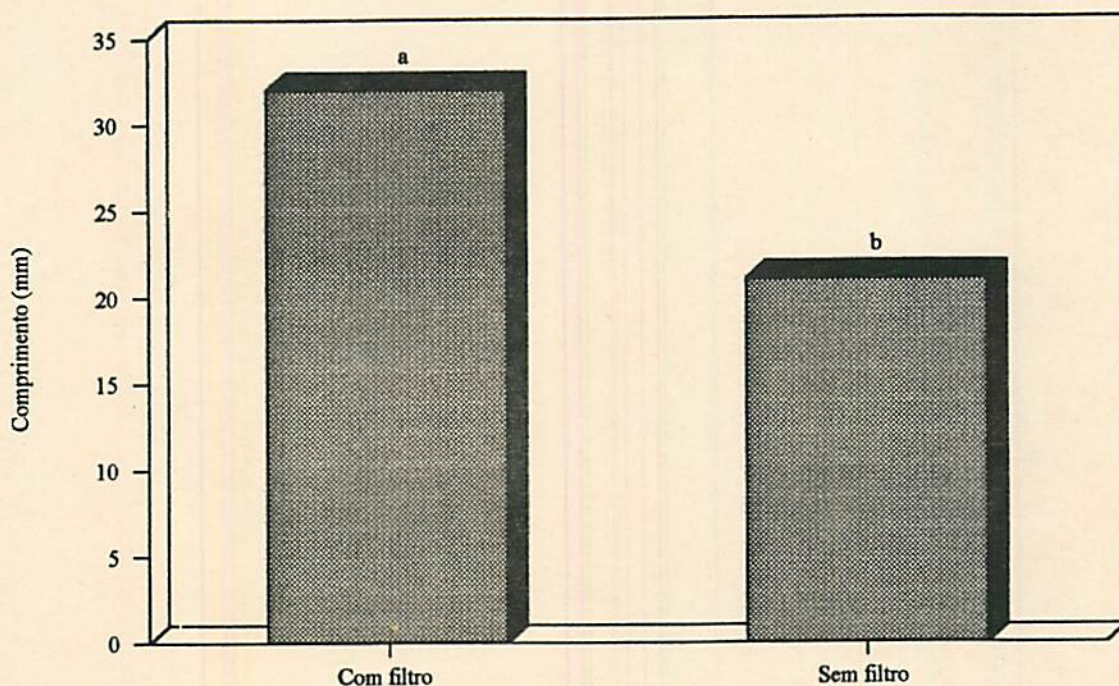


FIGURA 15. Representação gráfica do efeito do filtro amarelo no comprimento de gérbera de vaso Clone II. ESAL, Lavras - MG, 1994.

A porcentagem de vitrificação foi observada para os Clones II e III (Figura 16). Para os Clone II e III o filtro influenciou na porcentagem de vitrificação, o material sem filtro teve maior porcentagem de vitrificação (Figura 17).

As plântulas do Clone 800X, não apresentaram vitrificação, porém as plântulas sob o filtro mostraram sinais de toxidez. Este fato pode ser devido à não degradação do meio de cultura, ou melhor, não havendo a degradação de alguns elementos, comum no contato com a luz sem filtro, a concentração desses elementos se tornariam tóxicos. Na análise foliar dos nutrientes as plântulas sob o filtro obtiveram uma quantidade de nutrientes maior do que as plântulas sem o filtro (Tabela 7), principalmente para os elementos N, Fe, Mn e P. Esta maior concentração de nutrientes nas plântulas poderá ser devido à não destruição de enzimas importantes para o metabolismo desses elementos, principalmente, as enzimas do metabolismo do nitrogênio (redutases).

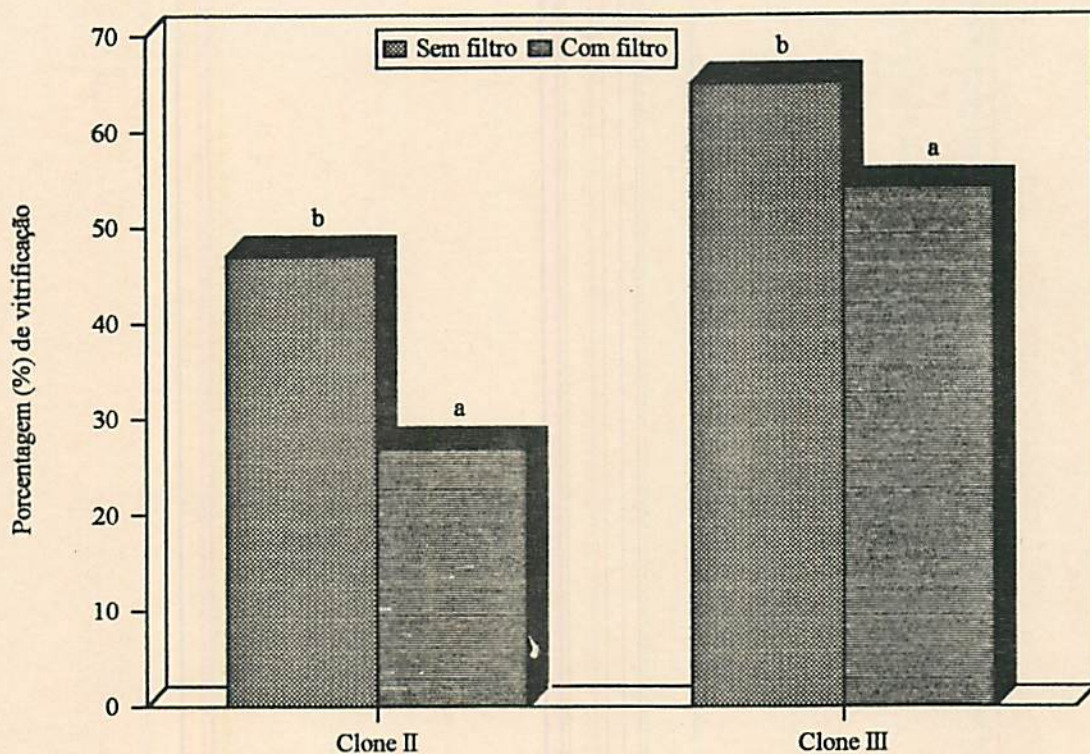


FIGURA 16. Representação gráfica do efeito do filtro amarelo na porcentagem de vitrificação de gérbera de vaso Clone II e III. ESAL, Lavras - MG, 1994.

A maior absorção do ferro ocorreu por ele estar disponível em maior quantidade no meio com filtro do que no meio sem o filtro devido à fotoxidação, o mesmo para os sais de nitrato.

Segundo Somers et al. (1983) e Campbell (1988), a luz influencia à nível de expressão de genes da nitrato redutase, enzima importante na assimilação do nitrogênio. No processo de absorção do nitrogênio há grupos prostéticos que formam a nitrato redutase como o molibdênio e o nitrito redutase com sulfato ferroso (Oaks e Hirel, 1985). Dessa maneira, a absorção do nitrogênio está ligada a outros minerais como molibdênio, enxofre e ferro e as deficiências desses minerais provoca também deficiência na absorção do nitrogênio.



FIGURA 17. Fotografia ilustrativa do efeito do filtro amarelo no comprimento de gérbera de vaso
Clone II. ESAL, Lavras - MG, 1994.

TABELA 7. Análise química foliar da gérbera de vaso Clone 800X com e sem filtro. ESAL, Lavras - MG, 1994.

Elementos	com filtro	sem filtro
N %	2,56	1,34
Mg %	0,30	0,26
Ca %	0,50	0,42
K %	2,37	2,54
P %	0,45	0,39
S %	0,43	0,41
Cu ppm	1,49	1,49
Zn ppm	134,75	140,25
Mn ppm	432,47	343,45
Fe ppm	218,70	197,85

4.4 CONCLUSÕES

O uso do filtro amarelo proporcionou maior crescimento das plântulas, uma maior concentração de nutrientes e uma menor porcentagem de plântulas vitrificadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPBELL, W.H. Nitrato redutase and its role in nitrate assimilation in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.74, p.214-291, 1988.
- ELKINS, K.; FELKER, F.C. Growth and biochemical differences between maize kernels cultured *in vitro* under red and blue light. **Plant Physiology**, Minnesota, v.102, p.8, 1993.
- HANGARTER, R.P.; STASINOPOULOS, T.C. Effect of Fe - Catalyzed Photooxidation of EDTA on Root Growth in Plant Culture Média. **Plant Physiology**, Washington, v.96, 843-847, 1991a.

- HANGARTER, R.P.; STASINOPOULOS, T.C. Repression of plant tissue culture growth by light is caused by photochemical change in the culture medium, **Plant Science**, Berkeley, v.79, p.253-257, 1991b.
- HERMAN, E.B. Micropropagation. In: HERMAN, E.B. (ed.). **Recent Advances in Plant Tissue Culture**. Agritech. Mohegn. 37-43, 1991.
- KAISER, W.M.; BRENDLE - BEHNISCH, E. Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase activity by photosynthesis. **Plant Physiology**, Washington, v.96, p.363-367, 1991.
- OAKS, A.; HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.36, p.3345-365, 1985.
- PIERIK, R.L.M. Closure of test tubes and flasks. In: PIERIK, R.L.M. (ed.) **In vitro culture of higher plants**. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishing, 1987. p.83-125.
- POTTER, T.I.; ROOD, S.B. Light intensity, gibberellins and growth in *Brassica*. **Plant Physiology**, Minnesota, v.102, p.8, 1993.
- ROOD, S.B.; ZANEWICH, K.P. Photocontrol of gibberellin metabolism in *Brassica*. **Plant Physiology**, Minnesota, v.102, p.8, 1993.
- STASINOPOULOS, T.C.; HANGARTER, R.P. Preventing photochemistry in culture media by long - Pass light filters alters growth of cultured Tissues. **Plant Physiology**. Washington, v.93, p.1365-1369, 1990.
- STAPLETON, A.E. Ultraviolet Radiation and Plants. Burning questions. **The Plant Cell**, Montpellier, v.4, p.1353-1358, 1992.
- SOMERS, D.A.; KVO, T.M.; KLEIN HOF, A.; WARNER, R.L.; OAKS, A. Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. **Plant Physiology**, Washington, v.72, p.949-952, 1983.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. California: The Benjamin Cummings Publishing Company, 1991.
- TOBIN, E. M.; SILVERHORNE, J. Light regulation of gene expressions in higher plants. **Annual Review Plant Physiology**. Palo Alto, v.36, p.369-373, 1985.
- VAN DEN BERG, J.H.; DAVIES, P.J.; EWING, E.E. Metabolism of gibberellins in dwarf and normal potato shoots under long and short photoperiods. **Plant Physiology**, Minnesota, v.102, p.8, 1993.

5 EFEITO DE DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO NO ENRAIZAMENTO DE GÉRBERA DE VASO *IN VITRO*

RESUMO

Estudou-se a influência de auxinas na indução do enraizamento utilizando dois Clone II e 800X de gérbera de vaso.

Para o Clone 800X estudou-se dosagens de AIA (0; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 mg/l) com a metade da concentração dos sais do meio MS. Com o Clone II foram estudados dosagens de IBA e ANA nas concentrações de 0,00; 0,01; 0,10; 1,00 mg/L com a metade da concentração dos sais do meio básico MS.

A melhor dosagem do AIA foi à 2 mg/L por fornecer maior número de raízes por planta (11,91), ter um comprimento de raiz de 1,12 cm e um comprimento da parte aérea maior 3,19 cm e apresentar número de folhas razoável 7,89.

Quanto ao IBA não houve diferença quanto ao número de raízes/planta e número de plantas enraizadas/tratamento.

A 0,1 mg/L de IBA, proporcionou menor percentagem de plantas vitrificadas (45%) com comprimento de raiz de 1,76 cm. Para o ANA também não houve diferença quanto ao número de raízes/planta e número de plantas enraizadas/tratamento. A menor percentagem de plantas vitrificadas foi encontrada no tratamento contendo 1,0 mg/L (64%) e a maior percentagem à 0,1 mg/L (83%). Para IBA a maior percentagem foi encontrada à 0,01 mg/L com 62%.

5.1 REFERENCIAL TEÓRICO

Na fase de enraizamento há fundamentalmente duas opções, uma delas é produzir a plântula enraizada ou repicar direto para a aclimação.

A escolha é determinada pela qualidade e quantidade do material estabelecido.

O número de gemas, tamanho, número de raízes por gema são parâmetros ainda insuficientes para verificar a eficiência. A qualidade do material é importante como vitrificação, necrose do ápice, ausência de raízes visíveis etc. (Debergh e Read, 1991).

Huang, Ni e Lin (1987) usaram metade da concentração de MS mais 0,03 mg/L de ANA para enraizamento de gérbera, enquanto Barbosa (1991) obteve melhores resultados utilizando 1/2 MS com 0,5 a 4 mg/L de AIA.

Huang e Chu (1985) utilizaram plântulas com 2 cm e as tratou com 0,1% de AIB por 30 segundos e depois transplantou obtendo 90% de enraizamento.

Pierik e Segers (1973), testaram fatores que afetam a formação de raízes em gérberas tais como concentração de sais e reguladores de crescimento. Induziram a formação de raízes à partir de nervura de folhas jovens de gérbera.

Murashige, Serpa e Jones (1974) obtiveram melhores resultados de enraizamento em gérbera utilizando de 3 a 1,0 mg/L de AIA, Petru e Matous (1984) também otiveram bons resultados usando níveis elevados de AIA.

Laliberte, Chretien e Vieth (1985) obtiveram 100% de enraizamento de gérbera em todas as concentrações de AIA estudadas (0,05; 0,10; 0,30; 0,50 e 1,00 mg/L).

Reynoird et al. (1993) para enraizamento de gérbera em experimentos de aclimação se utilizou do meio de enraizamento de Murashige e Skoog (1962), que é metade da concentração mais 0,25 μ M de ANA.

Chu e Huang (1983) quando utilizou combinação de altos níveis de citocinina (BA - 10 mg/L) e baixos níveis de auxina (AIA - 0,1 mg/L) em gérbera obteve indução de brotações. Por outro lado, quando aumentou o nível de AIA (5mg/L) induziu a formação de raízes. Este resultado prova que a organogênese de gérbera *in vitro* é também afetada pela razão auxina:citocinina.

Os principais fatores que controlam a morfogênese são os fitorreguladores, particularmente a relação auxina/citocinina no meio de cultura, fato este estabelecido no clássico trabalho de Skoog e Miller (1957).

Em geral as respostas das diferentes citocininas são muito semelhantes na maioria dos casos e, por essa razão prefere-se usar BA ou cinetina sintéticas que são mais baratas e normalmente induzem a multiplicação. No caso das auxinas, os tecidos podem apresentar respostas diversas de acordo com o tipo empregado. O 2,4-D induz calos determinante de embriogênese somática (Ammirato, 1983). O IBA é comumente utilizado para indução de raízes (Arelló, 1991).

Além do AIA e ANA que são muito utilizados no enraizamento, GA₃, e ABA podem ser usados isoladamente ou em combinação com as citocininas durante a indução do enraizamento (Nemeth, 1986).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Efeito de concentrações de AIA

Utilizou-se plântulas de gérbera de vaso Clone 800X para testar-se concentrações de AIA (0,0; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 mg/L) no meio de cultura com metade da concentração de MS e pH ajustado para 6,0. O meio de cultura foi autoclavado à 121°C durante 20 minutos. As plântulas foram inoculadas em tubos de ensaio 20 × 150 mm com 10 mL de meio e cultura. As plântulas mediam cerca de 10 mm de comprimento e possuíam 2 folhas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 10 repetições e 2 plântulas por repetição. As características avaliadas foram: número de raízes por plântula, número de folhas e comprimento da parte aérea.

5.2.2 Efeito de concentrações de ANA e IBA

Foram testadas gérberas de vaso Clone II nas concentrações de ANA e IBA à 0,0; 0,01; 0,10; 1,00 mg/L no meio básico MS com metade da concentração dos sais. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 10 repetições e 4 plântulas por repetição. As características avaliadas foram: número de raízes por plântula, número de plântulas enraizadas, comprimento de raízes e porcentagem de vitrificação.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o Clone 800X verificou-se que as características podem ser representadas, em função das concentrações de AIA, através das equações de regressão polinomial de terceiro grau conforme Tabela 8.

TABELA 8. Valores médios do comprimento da parte aérea e raiz, número de raízes/plântula e número de folhas da gérbera de vaso Clone 800X em função das concentrações do AIA. ESAL, Lavras - MG, 1994.

AIA (mg/L)	Número Raízes/plântula	Comprimento (mm)		Nº de folhas
		Raiz	Parte aérea	
0,00	2,6	19,7	11,9	7,7
0,05	1,7	35,6	22,7	6,6
0,10	1,9	24,2	28,2	6,3
0,30	2,7	09,6	14,2	8,7
0,50	5,9	24,9	26,2	7,2
1,00	6,1	22,3	24,3	7,1
2,00	11,9	11,2	31,9	7,8
10,0	11,2	04,3	17,1	5,4
Média Geral	5,5	18,9	22,0	7,2
CV (%)	36,75	22,33	17,15	25,32
$Y = 2,66 + 1,8923955X - 0,56045654X^2 + 0,039064888X^3$				$R^2 = 94\%$
$Y_{cr} = 19,7 - 2,204927X + 0,00882764X^2 + 0,000427189X^3$				$R^2 = 68\%$
$Y_{cpa} = 11,9 + 0,390284X - 0,15617517X^2 + 0,011202088X^3$				$R^2 = 58\%$
$Y = 2,738791 + 0,3245902X - 0,17239401X^2 + 0,013691693X^3$				$R^2 = 88\%$

O ponto máximo para número de raízes/plântula foi observado em uma concentração AIA de 2 e 10 mg/L. E à 2 mg/L de AIA concordou também quanto ao maior comprimento da parte aérea 3,19 cm e número de folhas 7,89.

Em todos os tratamentos houve 100% de enraizamento, sendo estes resultados concordantes com os de Barbosa (1991) e Laliberte, Chretien e Vieth (1985).

Observou-se ainda que conforme diversos autores (Pierik e Segers 1973; Petru e Matous, 1984; Nagao et al., 1993; Ferri e Fortes, 1993; Leite et al., 1993; Abreu, Martins e Pinto, 1993) o uso do AIA na indução do enraizamento teve excelente efeito nas diversas concentrações em que foi utilizado.

O tratamento sem AIA também induziu o enraizamento. Provavelmente, os níveis endógenos de AIA parecem ter sido responsáveis pela indução e o desenvolvimento de raízes que se igualou em número de raízes/plântula até 0,5 mg/L dos tratamentos complementados com AIA exógeno.

Bornman (1983), ressaltou que para um melhor desenvolvimento do sistema radicular, as auxinas devem ser usadas apenas como indutoras da formação de raízes e quando empregadas em altas concentrações devam ser subtraídas do meio de cultura. É provável que isto tenha ocorrido no presente trabalho à 5 mg/L de AIA, induzindo 2,71 raízes/plântula, porém à 10 mg/L de AIA, induziu 11,29 raízes/plântula em média.

À esse nível de 5 mg/L de AIA além de ocorrer baixo número de raízes coincidiu com o menor comprimento da parte aérea e menor número de folhas.

Nos níveis de 2 e 10 mg/L houve maior indução de raízes/plântula. Provavelmente nesses níveis a concentração de AIA livre seja suficiente para indução de raízes conforme Burstron (1953), o qual aceita a forma aniônica da auxina como realmente ativa. Como a auxina age de modo direto sobre a divisão e alongamento celular, a suplementação principalmente à nível de 2 mg/L além de induzir maior número de raízes também induziu maior comprimento da parte aérea.

Com o Clone II ao se estudar níveis de IBA e ANA (0,00; 0,01; 0,10; 1,0 mg/L) não foi encontrado diferenças significativas para número de raízes por plântula, e nem de número de plântulas enraizadas, ou seja, em todos os tratamentos todas as plantas enraizaram em número médio igual em todos os tratamentos.

Esses resultados concordam com Barbosa (1991) em relação ao ANA, este usou as seguintes concentrações 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 mg/L e obteve enraizamento em todos os tratamentos. E quanto ao IBA os resultados concordam com Arello (1991) onde em todos os níveis houve indução de enraizamento inclusive a nível 0 de IBA.

Para comprimento de raízes a concentração que favoreceu um menor comprimento de raízes foi com 1,0 mg/L de ANA e 0,01 mg/L de IBA (Figura 18).

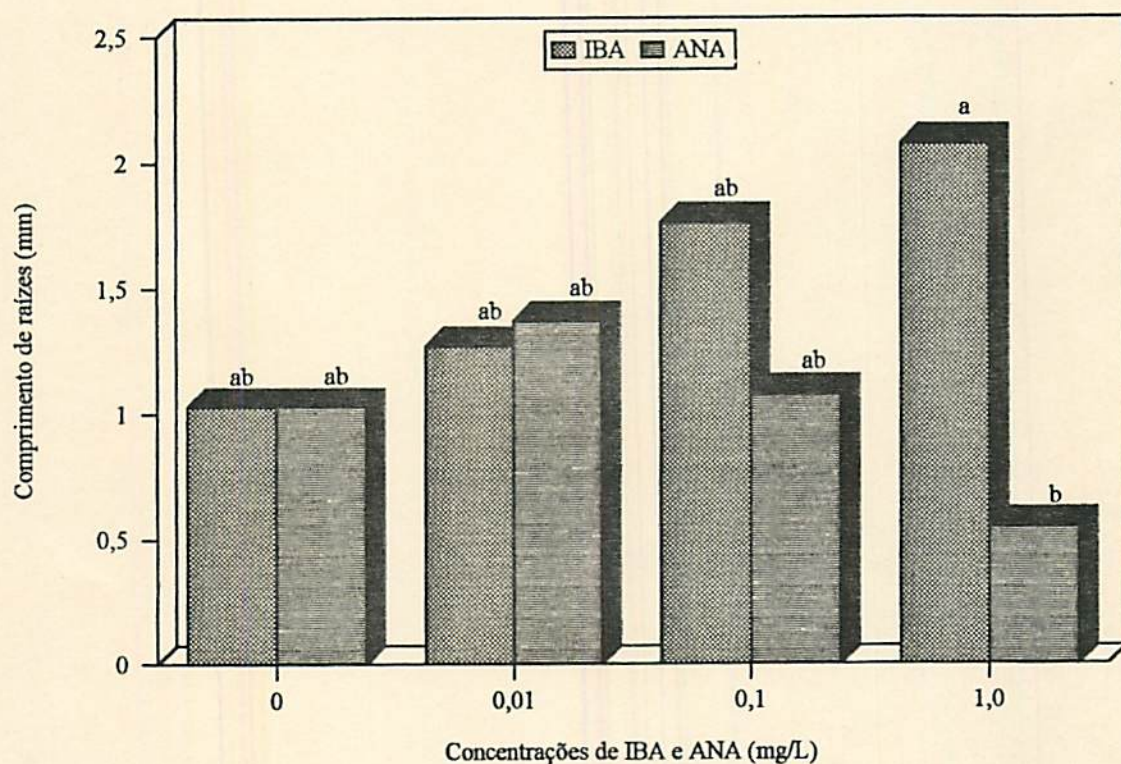


FIGURA 18. Representação gráfica do efeito do IBA e ANA no comprimento de raízes de gérbera de vaso Clone II, ESAL, Lavras - MG, 1994.

Pode-se perceber que o ANA e o IBA atuaram inversamente quanto ao comprimento. Na concentração 1,0 mg IBA foi maior e ANA menor e vice versa.

Quanto à porcentagem de vitrificação com o uso de IBA a menor taxa observada na concentração foi 0,1 mg/L com 45% e à maior na concentração de 0,01 mg/L com 62%. Para o uso de ANA a menor porcentagem ocorreu na concentração 0,1 mg/L 83% (Figura 19).

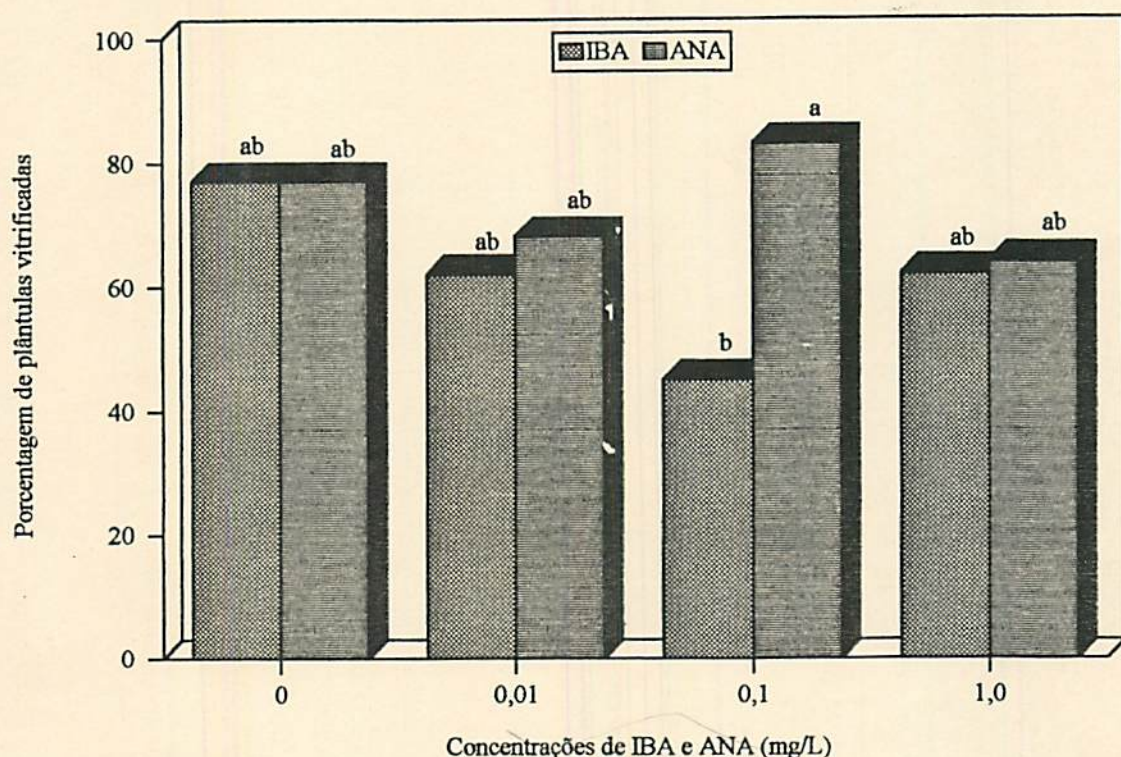


FIGURA 19. Representação gráfica do efeito do IBA e ANA na porcentagem de vitrificação de gérbera de vaso Clone II. ESAL. Lavras - MG, 1994.

Analizando comparativamente as Figuras 18 e 19 verifica-se que o ANA e IBA agiram de forma antagônica quanto as características comprimento e porcentagem de plântulas vitrificadas.

Segundo Debergh (1981) vitrificação é um fenômeno relacionado principalmente com concentrações de citocininas.

Kevers et al. (1984) relata também que altas concentrações de auxina também provocam vitrificação.

5.4 CONCLUSÕES

Para o Clone 800X a melhor concentração de AIA foi a de 2 mg/L, pois favoreceu um bom enraizamento (12 raízes/plântula de 11 mm de comprimento) e uma boa qualidade da parte aérea (8 folhas/plântulas e comprimento de 31,9 mm).

Para o Clone II a melhor concentração de IBA foi a de 0,1 mg/L por favorecer menor percentagem de vitrificação (45%) e um comprimento de raiz de 17,6 mm.

Quanto ao ANA, a melhor concentração foi a de 1,0 mg/L com 64% de vitrificação e com comprimento de raiz de 5,4 mm. O IBA foi melhor que o ANA por apresentar menor percentagem de vitrificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, I.N.; MARTINS, M. PINTO, J.E.B.P. Efeito de compostos fenólicos no enraizamento de microestacas de *E. citriodora*, "in vitro". In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, Brasília, 1993. **Programas e Resumos...** Brasília: EMBRAPA, 1993. p.148.
- ARELLO, E.F. Aspectos gerais do comportamento "in vitro" de *Kielmeyera coriacea* Martins (Guttiferae): Produção e enraizamento de brotações. Lavras: ESAL, 1991. 148p. (Tese - Mestrado em Fitotecnia).
- AMMIRATO, P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, (c/eds.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Mcmillan Publishing, 1983. v.1, p.83-123.

- BARBOSA, M.H.P. Propagação "in vitro" de *Gerbera jamesonii* Bolus in Hook através de capítulos jovens. Lavras: ESAL, 1991. 48p. (Tese - Mestrado em Fitotecnia).
- BORNMAN, C.H. Possibilities and constraints in the regeneration of tree from cotyledonary needles of *Picea abies* "in vitro". *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.57, p.5-16, 1983.
- BURSTROM, H. Physiology of root growth. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.4, p.237-252, 1953.
- CHU, C.; HUANG, M. *In vitro* formation of gerbera (*Gerbera hibryda* Hort.) plantlets through excised scape culture. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, Taiwan, v.52, n.1, p.45-50, 1983.
- DEBERGH, P.C.; HARBAOVI, Y.; LEMEUR, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.53, p.181-187. 1981.
- DEBEREG, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN R.H. (eds.). *Micropropagation*, Netherlands, 1991. p. 1-13
- FERRI, V.C.; FORTES, G.R.L. Avaliação da eficácia de três reguladores de crescimento no enraizamento "in vitro" de Kiwi (*Actinidia deliciosa*) A. Chev.) CV. Matua. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, Brasília, 1993. *Programas e Resumos...* Brasília: EMBRAPA, 1993. p.126.
- HUANG, M.C.; CHU, C.H. Ascheme for commercial multiplication of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort). Through Shoot tip culture. *Journal of the Japonense Society for Horticulturrae Science*, Taiwan, v.54, n.1, p.94-100, 1985.
- HUANG, J.M.; NI, Y.Y.; LIN, M.H. The micropropagation of gerbera. *Acta Horticultural Sinica*, Skierniewice, v.14, n.2, p.125-128, 1987.
- KEVERS, C.; COUMANS, M.; COUMANS, G.; GASPAR, T. Physiological and Biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. *Physiologia Plantharum*, Copenhagen, v.61, p.69-74, 1984.
- LALIBERTE, S.; CHRETIEW, L.; VIETH, J. *In vitro* plantle production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. *HortScience*, Riverside, v.20, n.1, p.137-139, 1985.
- LEITE, D.L.; PETERS, J.A.; FORTES, F.R.L. NAKASU, B.H. The effect of Indol Butyric acid on 'in vitro' rooting of pear, 'Bertlett', Hosui', 'Okusankichi', cvs. and a 'OH x F97' clone rootstock. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, Brasília, 1993. *Programas e Resumos...* Brasília: EMBRAPA, 1993. p.112.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- MURASHIGE, T.; SERPA, M.; JONES, J.B. Clonal multiplication of gerbera through tissue culture. **HortScience**, Riverside, v.9, n.3, p.175-180, 1974.
- NAGAO, E. O.; PASQUAL, M.; OLIVEIRA, P.D. RAMOS, J.D. Enraizamento "in vitro" de Brotações de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. sob a influência de sacarose e AIB. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, Brasília, 1993. **Programas e Resumos...** Brasília: EMBRAPA, 1993. p.140.
- NEMETH, G. Induction of Rooting chapter. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin: Springer-Verlag Berlím Heidelberg, 1986. p.49-64 (Trees, 1, v.1).
- PETRU, E.; MATOUS, J. *In vitro* cultures, of gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus). **Zahadnictvi**, Prague, v.11, n.4 p.309-314, 1984.
- PIERIK, R.L.M.; SEGERS, T.A. *In vitro* culture of midrib explants of gerbera: Adventitious root formation and Callus induction. **Zeitschrift fur Pleanzenphysiol**, Stuttgart, v.69, p.204-212. 1973.
- REYNOIRD, J.P. CHRIQUI, D.; NOIN, M.; BROWN, S.; MARIE, D. Plant regneration from *in vitro* leaf culture of several *Gerbera* species. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.33, p.203-210, 1993.
- SKOOG, F.; MILLER, C. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symposium Society Experiment Biology**, Cambridge, v.11, p.118-130, 1957.

6 INFLUÊNCIA DA MICORRIZA NA FASE DE ACLIMATAÇÃO DE PLÂNTULAS DE GÉRBERA DE VASO MICROPROPAGADAS

RESUMO

Plântulas de gérbera de vasos micropropagadas *in vitro* foram utilizadas para testar o efeito de fungos micorrízicos na fase de aclimatação. Os fungos testados foram *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum*, *Gigaspora margarita* e inóculo múltiplo. Os clones estudados foram o II e 800X. Para o Clone II a nível de pesos de matérias fresca e seca a testemunha e *Gigaspora margarita* apresentaram os menores resultados e o *Glomus clarum* o melhor resultado, o mesmo ocorrendo com o número de folhas. A análise mineral indicou que os inóculos foram superiores em N, P, K, Ca, Mg e Cu. Em relação ao peso da matéria fresca da raiz, número de raízes/planta, comprimento de raízes e área foliar não houveram diferenças, mas a testemunha foi inferior em pelo menos 2% em relação aos inóculados. Quanto ao Clone 800X, a testemunha e *Gigaspora margarita* apresentaram os menores valores para pesos de matérias fresca e seca da parte aérea, comprimento da parte aérea, número de folhas, peso de matérias fresca e seca de raízes e número de raízes e o inóculo múltiplo apresentou os maiores valores.

A análise química foliar revelou que o inóculo múltiplo proporcionou maior absorção de P, S, Ca, Mg e Cu. Dessa maneira pode-se concluir que para o Clone II o melhor inóculo foi o *Glomus clarum* e para o Clone 800X o inóculo múltiplo, além dos resultados mostrarem uma certa dependência da gérbera em relação à micorriza.

6.1 REFERENCIAL TEÓRICO

O sucesso do sistema de micropropagação depende da eficiência da transferência de plantas regeneradas da cultura de tecidos para casa de vegetação.

Este estágio de transferência é ainda problemático por muitos fatores, como por exemplo o sistema vascular pouco desenvolvido e uma desidratação excessiva após a remoção da cultura para aclimação. Essa desidratação é devido à reduzida cera na epiderme e a um funcionamento anormal do estômato (Sallanom, Fort e Coudret, 1993).

A plântula de cultura de tecidos tem um sistema radicular ainda não adaptado ao ambiente. Portanto, a inoculação com micorriza parece ser uma alternativa viável para aclimação dessas plântulas.

A qualidade da raiz é fator determinante para sobrevivência das plantas na fase de transplante.

Siqueira e Franco (1988) relataram os benefícios da micorriza no aumento da capacidade de sobrevivência e crescimento inicial de mudas transplantadas. Siqueira (1985) cita também que em espécies ornamentais diversas mudas pré-colonizadas obtiveram 100-117% de resposta quando inoculadas com 2 a 50 g de inoculante por planta.

Siqueira (1985) definiu micorriza como "simbiose endofítica, biotrófica mutualística prevalente na maioria das plantas vasculares nativas e cultivadas espalhadas por toda a terra, sendo caracterizada pelo contato íntimo e perfeita integração morfológica entre o fungo e a planta pela regulação funcional e troca de metabólitos ajustada de modo a trazer benefícios mútuos".

O emprego das micorrizas vesículo arbuscular tem sido considerado uma possível alternativa para a redução de insumos (fertilizantes e pesticidas) na agricultura desde a década

passada devido aos efeitos benéficos no crescimento das plantas de interesse agrônômico, hortícola, florestal e pastoril. Os efeitos benéficos devido a inoculação com esses fungos podem ser bastante acentuados em diversos processos como: na absorção e conservação de nutrientes, na fixação biológica de nitrogênio, sobre os patógenos do solo, na relação água-planta, na produção de hormônios, na anatomia da planta e na agregação do solo (Lopes, Siqueira e Zambolim, 1983).

A pré-inoculação de mudas de maçã produzidas através da micropropagação (Lin et al., 1987b) e em pera (Lin et al., 1987a) tem-se mostrado uma alternativa muito promissora em relação ao alto custo dos fertilizantes.

Sato, Pinto e Oliveira (1986) obtiveram resultados positivos quando aclimataram plantas de mandioca micropropagadas inoculadas com o fungo endomicorrízico *Glomus clarum*.

Em plântulas micropropagadas de gérbera transferidas para substrato de esfagno sob condições controladas foi testado *Glomus intraradixi* e *Glomus vesiculiferum*, com o controle. O nível de sobrevivência das plantas inoculadas foi significativamente maior que o controle, assim como, o peso de matéria seca. Nas plantas micorrizadas obteve-se alta concentração de fósforo no tecido e baixo potencial de água. Isto indica que essas plantas são capazes de melhor adaptação em condições de stress como as encontradas no período de aclimatação (Huiming et al., 1993). Hamel e Smith (1991) constataram que plantas micorrizadas contém alta concentração de fósforo no tecido. Declerk et al. (1993) testaram duas espécies de MVA, *Glomus mosseae* e *Glomus geosporum* em plântulas de banana micropropagadas para estudar o efeito da inoculação no crescimento e nutrição. Disto resultou alto peso de matéria seca da parte aérea e matéria fresca das raízes. A simbiose aumentou a concentração de fósforo e potássio quando comparado com o controle. *G. mosseae* mostrou maior intensidade de colonização de raízes e presença de arbúsculos resultando maior peso de matéria seca das raízes e

P quando comparados com o *G. geosporum*. Heggo e Angle (1990) inoculando a soja com bactéria de solo e fungo MVA obtiveram aumento no peso de matéria seca nitrogênio e fósforo foliar. A inoculação com fungo MVA reduziu a concentração de Zn, Cd e Mn em folhas de plantas desenvolvidas em solos com alta concentração desses metais.

Duck et al. (1986) estudando o efeito do fungo MVA e zinco no crescimento de duas espécies de grama (*Festuca rubra* e *Calamagrostis epigejos*) constataram que a colonização pelo fungo MVA reduziu o efeito tóxico do zinco. Cobre e Cadmio aumentaram na planta com a colonização de raízes com o fungo MVA (Cooper e Linker, 1978).

Koomen e McGrath (1990) relatam que algumas espécies de micorrizas protegem as plantas do efeito tóxico de metais pesados. Bradley, Burt e Read (1981) verificaram que Cu e Zn foram retirados de raízes de *Calluna vulgaris* infectadas por micorrizas ericoidais.

Kilham e Firestone (1983) relatam que a micorriza aumenta a concentração de cobre e níquel no tecido das plantas.

Os fungos micorrízicos são frequentemente associados com matéria orgânica. O aumento das hifas e crescimento saprofítico do fungo ocorre na presença de matéria orgânica e o aumento da atividade da fosfatase tem sido observado na rizosfera de plantas micorrizadas (St John, Coleman e Reid, 1983).

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos da ESAL. O material utilizados foram dois clones (Clone II e 800X) provenientes de plântulas micropropagadas *in vitro*.

O substrato utilizado foi composto por 30% de terra, 20% de areia fina e 50% de torta de filtro e esterilizado à 200°C por dois dias para testar o Clone II e para o Clone 800X, o substrato foi esterilizado com brometo de metila.

Para o Clone II, os tratamentos foram: testemunha, *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum*, *Gigaspora margarita* e para o Clone 800X foi acrescido do Inóculo múltiplo (mistura das 3 estirpes).

Os esporos foram fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia do Solo da ESAL, sendo que concentração de esporos para 50 ml de substrato variou de 90 a 500 unidades.

As plântulas enraizadas *in vitro* permaneceram nos tubos na casa de vegetação por uma semana antes de serem transferidas para o substrato. Após esse período o ágar das raízes foi lavado com água corrente e as plântulas foram homogeneizadas em tamanho aproximado de 50 mm para cada tratamento. Em seguida foram transplantadas em bandejas de isopor com 72 células. Na primeira semana as bandejas foram aclimatadas em uma mini-estufa e sombrite 50% na casa de vegetação. As plântulas foram irrigadas com água destilada.

Foram feitas duas avaliações para o Clone II aos 30 e 60 dias após o plantio, e para o Clone 800X, apenas uma avaliação aos 60 dias.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, sendo que para o Clone II, usou-se 4 repetições com duas plantas por repetição, e para o Clone 800X, 6 repetições com 5 plantas por repetição.

As características avaliadas foram: peso das matérias fresca da parte aérea e raiz, número de folhas e raízes, comprimento da parte aérea e da raiz, taxa de colonização das raízes, análise foliar e ainda para o Clone II a área foliar específica.

A taxa de colonização foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Solo da ESAL segundo metodologia de Giovanetti e Mosse (1980). A área foliar, foi medida utilizando-se o um planímetro, segundo metodologia proposta por Sestak et al. (1971).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Clone II:

Para o Clone II o peso da matéria fresca da parte aérea da testemunha aos 30 e 60 dias apresentou os menores resultados em relação aos tratamentos inoculados. Aos 30 dias, *G. clarum* foi o que apresentou os melhores resultados, não havendo diferença entre os inoculados aos 60 dias (Figura 20).

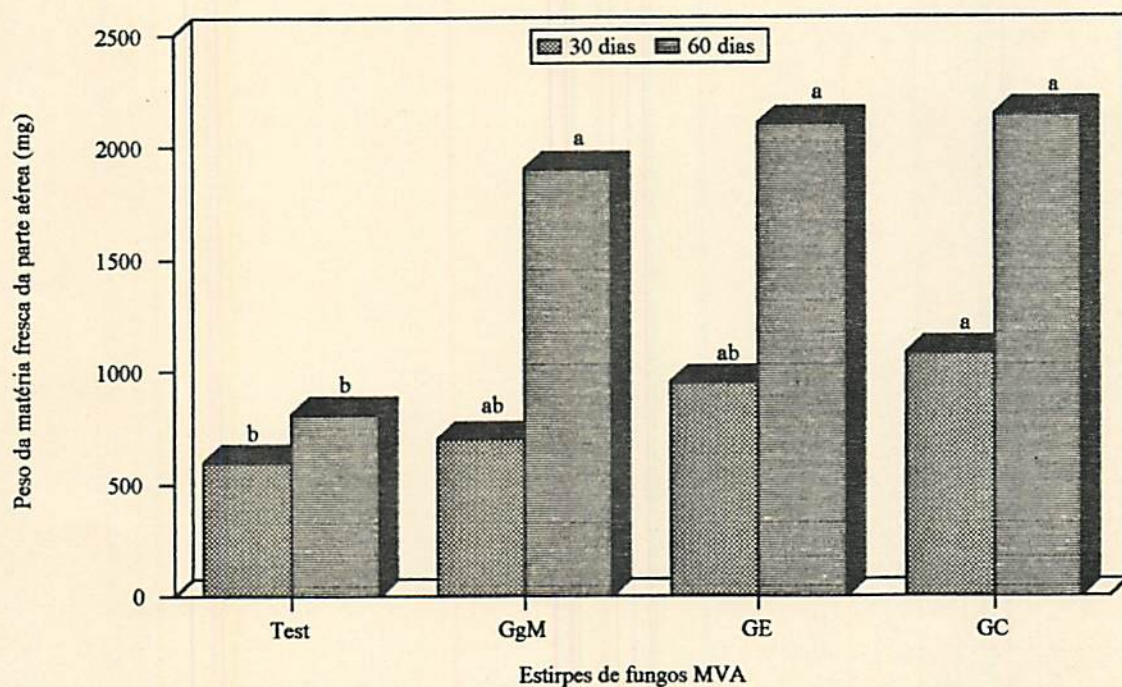


FIGURA 20. Representação gráfica do efeito dos fungos MVA (*Gigaspora margarita*, *Glomus etunicatum* e *Glomus clarum*) na matéria fresca da parte aérea de gérbera de vaso Clone II aos 30 e 60 dias. ESAL, Lavras - MG, 1994.

Quanto ao peso de matéria seca da parte aérea aos 30 dias a testemunha e *Gigaspora margarita* apresentaram os menores valores e *G. clarum* o maior peso. Aos 60 dias o menor peso de matéria seca foi a testemunha não havendo diferença significativa entre os inoculados (Figura 21).

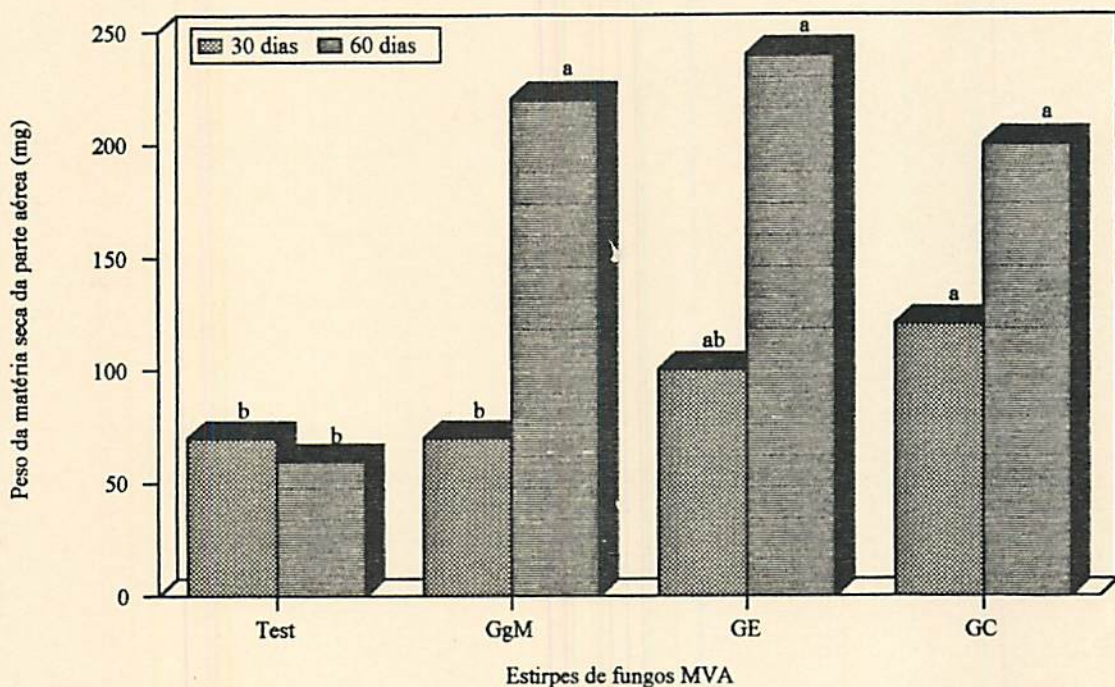


FIGURA 21. Representação gráfica do efeito dos fungos MVA (*Gigaspora margarita*, *Glomus etunicatum*, *Glomus clarum*) na matéria seca da parte aérea de gérbera de vaso Clone II aos 30 e 60 dias. ESAL, Lavras - MG, 1994.

Quando ao número de folhas, a testemunha foi a que apresentou aos 30 dias o menor número (12,2) e o maior número foi obtido em plântulas tratadas com *Glomus clarum* (20,37). Aos 60 dias, não foram observadas diferenças (Figura 22).

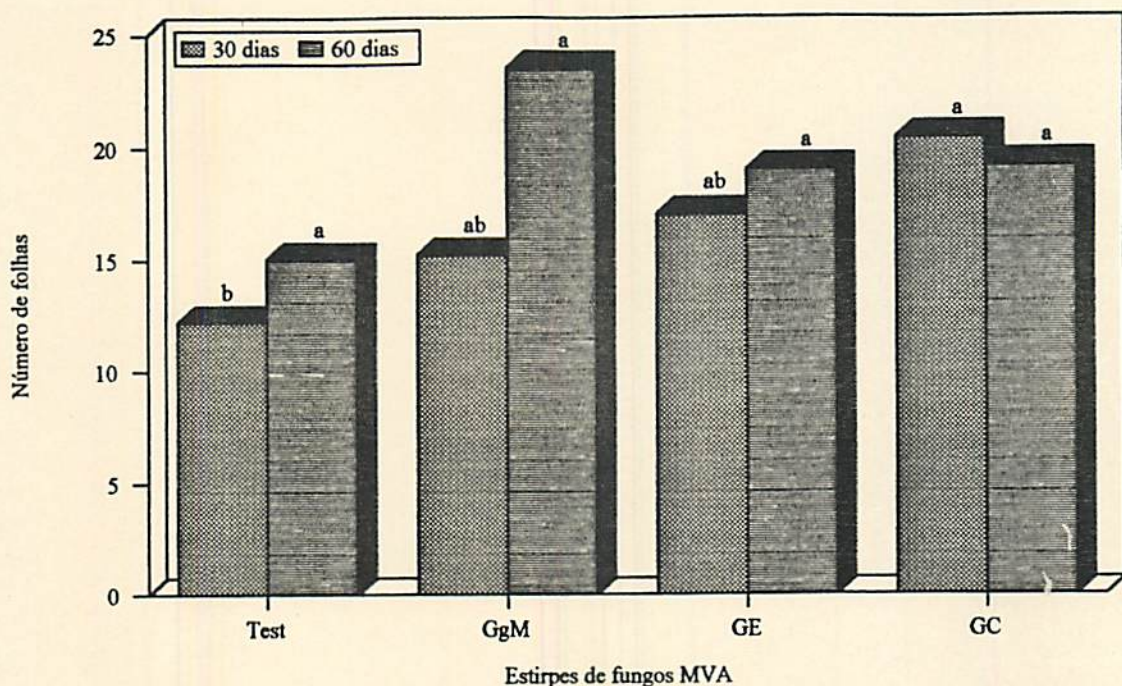


FIGURA 22. Representação gráfica do efeito dos fungos MVA (*Gisgasporea margarita*, *Glomus etunicatum*, e *Glomus clarum*), no número de folhas de gérbera de vaso Clone D aos 30 e 60 dias. ESAL. Lavras - MG, 1994.

Na determinação de matéria fresca da raiz aos 30 dias, não foram detectadas diferenças e aos 60 dias o menor peso foi para a testemunha (720 mg), não havendo no entanto diferenças entre os inoculados (Figura 23).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9, o número de raízes/planta, comprimento de raízes e área foliar não apresentaram diferenças. No entanto apenas o comprimento de raízes das plântulas inoculadas foram superiores à testemunha, aos 60 dias.

Apesar da não significância para número de raiz/planta aos 60 dias, a testemunha foi 49% em média inferior aos tratamentos inoculados. Para comprimento de raiz a testemunha apresentou-se inferior aos 60 dias 39% e a área foliar específicas aos 30 dias (22%) em relação aos tratamentos inoculados.

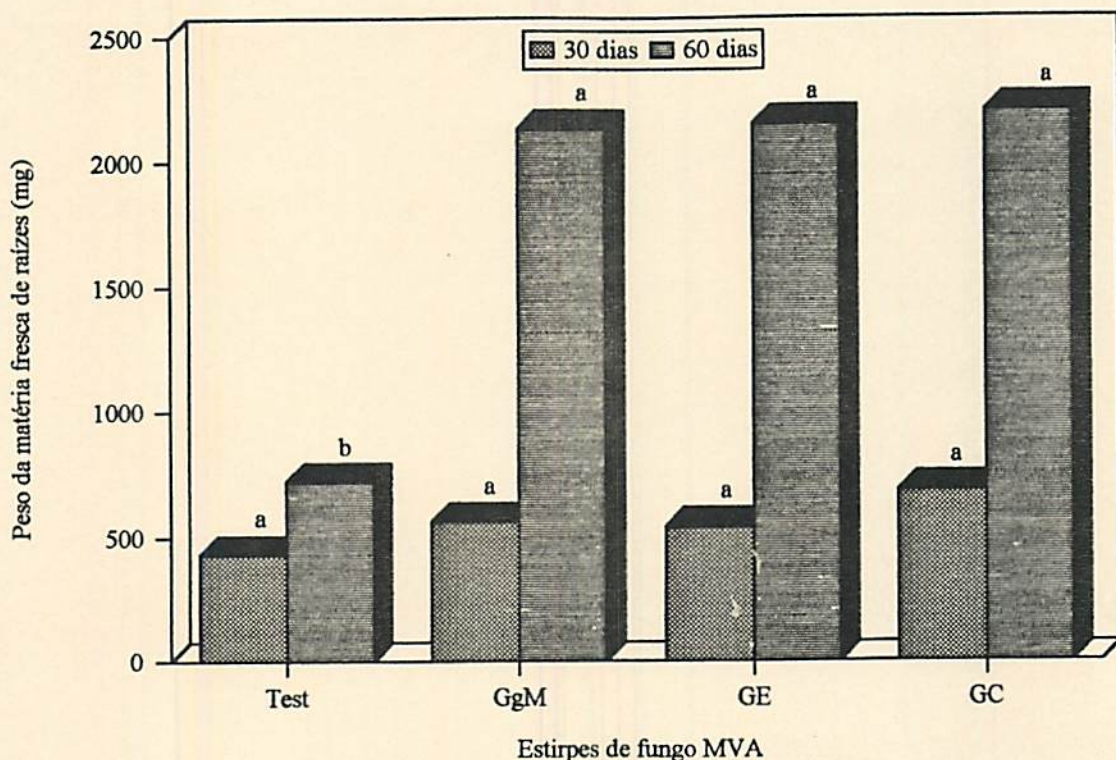


FIGURA 23. Representação gráfica do efeito dos fungos MVA (*Gigaspora margarita*, *Glomus etunicatum*, e *Glomus clarum*) nos pesos de matérias fresca e seca das raízes de gérbera de vaso Clone II aos 30 e 60 dias. ESAL, Lavras - MG, 1994.

TABELA 9. Efeito dos fungos MVA (*Gigaspora margarita*, *Glomus etunicatum* e *Glomus clarum*) no número de raízes/planta, comprimento da raiz, porcentagem de colonização e área foliar específica de gérbera Clone II aos 30 e 60 dias. ESAL, Lavras - MG, 1994.*

MVA	Nº raiz/pl		Comprimento de raiz		% Colonização		Área foliar espec. aos 30 dias (cm ³)
	30	60	30	60	30	60	
Testemunha	7,5 a	7,8 a	5,1 a	6,7 b	11 c	32 b	3,89 a
Gig. M.	8,1 a	11,7 a	6,9 a	10,2 a	74 a	65 a	4,66 a
GE	9,1 a	11,1 a	5,9 a	11,6 a	47 b	30 b	5,03 a
GC	6,6 a	12,1 a	6,5 a	11,2 a	68 a	38 b	4,51 a

* Médias seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente pelo teste Tukey a 5%.

Em relação à porcentagem de colonização aos 30 dias a *Gigaspora margarita* e o *Glomus clarum* foram superiores e aos 60 dias a *Gigaspora margarita* foi superior à todos os tratamentos (Tabela 9).

Observou-se ainda que a porcentagem de colonização dos inóculos diminuiu de 30 para 60 dias e a testemunha aumentou, isto provavelmente ocorreu devido à competição dos inoculados com fungos indígenas, pois neste experimento a água de irrigação não foi filtrada.

Quanto à análise mineral principalmente para N, P, K, Ca, Mg e Cu os tratamentos inoculados foram superiores (Tabela 10).

TABELA 10. Comparação da análise de nutrientes foliares após 30 dias nas plântulas de gébera de vaso Clone II inoculados com fungos *Glomus clarum*, *G. etunicatum*, *Gigaspora margarita* e a testemunha. ESAL, Lavras - MG, 1994.

MVA	Minerais									
	%						ppm			
	N	P	K	S	Ca	Mg	Mn	Zn	Cu	Fe
Testemunha	1,9	0,14	0,15	0,15	1,13	0,21	263,0	68,6	9,8	490,0
<i>Gig. M.</i>	2,8	0,30	0,26	0,18	1,50	0,36	265,3	77,5	22,8	524,0
<i>G. clarum</i>	3,6	0,31	0,19	0,18	1,37	0,34	263,4	60,8	22,9	489,4
<i>G. etunicatum</i>	3,3	0,33	0,24	0,19	1,62	0,47	255,6	70,0	25,0	519,6

No experimento realizado houve morte das plântulas não micorrizadas, pois este foi instalado em um período de clima ameno (junho).

Clone 800X:

Para o Clone 800X quanto ao peso de matéria fresca da parte aérea os menores valores foram para a testemunha (480 mg) e *Gigaspora margarita* (790 mg) enquanto os

inoculados *Glomus clarum*, *G. etunicatum* e inóculo múltiplo apresentaram os maiores valores, de 1720 à 2430 mg. Silva et al. (1991) testando plântulas de gérbera micropropagadas com *Acaulospora scrobiculata*, *Gigaspora margarita*, *Glomus clarum* e *G. etunicatum* obtiveram melhores resultados com *Glomus etunicatum* e *G. clarum* em peso de matéria fresca e seca da parte aérea.

Quanto ao peso da matéria seca da parte aérea a testemunha (70 mg) e a *Gigaspora margarita* (107 mg) apresentaram os menores valores e o inóculo múltiplo o maior valor (271 mg). Em relação ao comprimento da parte aérea a testemunha (51,3 mm) e a *Gigaspora margarita* (53 mm) apresentaram os menores resultados e os demais inóculos os maiores valores (77,8 a 85,6 mm) não havendo diferença significativa entre esses últimos. Quanto ao número de folhas a testemunha apresentou o menor número de folhas (7,38) e o inóculo múltiplo o maior número de folhas (13,67).

Ao avaliar matéria fresca da raiz os menores valores foram da testemunha (56 mg) e *Gigaspora margarita* (57 mg) e o maior inóculo múltiplo (118 mg), e quanto à matéria seca não houve diferença estatística quanto aos tratamentos apesar da testemunha e *Gigaspora margarita* serem inferiores em quase 50%. Quanto ao comprimento de raiz, também, não houve diferença significativa entre os fungos MVA, mas quanto ao número de raízes, os menores valores foram da testemunha e *Gigaspora margarita* e o maior número de raízes foi obtido com o inóculo múltiplo (Tabela 11 e Figura 24).

Na análise foliar observou-se que, principalmente quanto a P, S, Ca, Mg e Cu o inóculo múltiplo absorveu maiores concentrações. Para K a testemunha e *Gigaspora margarita* absorveram maiores concentrações (Tabela 12).

TABELA 11. Valores médios de pesos de matérias fresca e seca da parte aérea e da raiz, comprimento da parte aérea e da raiz, número de folhas e de raízes e porcentagem de colonização de gérbera de vaso Clone 800X em função dos fungos MVA (*Gigaspora margarita*, *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum* e inóculo múltiplo - mistura dos três). ESAL, Lavras - MG, 1994.

MVA	Matéria				Comprimento (mm)		Número		% Colonização
	Fresca (mg)		Seca (mg)		Parte aérea	Raiz	folhas	raízes	
	Parte aérea	Raiz	Parte aérea	Raiz					
Testem.	480,0 b	56,0 b	70,0 c	96,0 a	51,3 b	94,8 a	7,38 c	9,23 b	0 d
Gg. M.	790,0 b	57,0 b	107,0 c	70,0 a	53,0 b	109,6 a	8,89 bc	9,49 b	31,29 ab
G.C.	1720,0 a	94,0 ab	196,0 b	146,0 a	77,8 a	118,8 a	10,59 abc	11,43 ab	27,97 b
G.E.	1770,0 a	98,0 ab	214,0 ab	117,0 a	80,0 a	122,1 a	12,59 ab	12,86 ab	16,84 c
In.Mul.	2430,0 a	118,0 a	271,0 a	166,0 a	85,6 a	125,7 a	13,67 a	13,71 a	40,47 a

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey 5%.



FIGURA 24. Fotografia ilustrativa do efeito da micorriza na gérbera de vaso Clone 800X. A - testemunha, B - *Gigaspora margarita*, C - *Glomus clarum*, D - *Glomus etunicatum*, E - inóculo múltiplo. ESAL, Lavras - MG, 1994.

TABELA 12. Teores médios dos minerais obtidos na análise química foliar da gérbera de vaso Clone 800X, após 60 dias da inoculação em função dos fungos MVA (testemunha, *Gigaspora margarita*, *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum*, e inóculo múltiplo). ESAL, Lavras - MG, 1994.

MVA	Minerais								
	%					PPM			
	P	K	S	Ca	Mg	Mn	Zn	Cu	Fe
Teste	0,09	3,11	0,25	1,58	0,24	228,21	76,9	13,0	591,9
Gig.M.	0,10	2,68	0,22	1,69	0,31	226,85	81,7	10,6	545,8
G.C.	0,15	1,84	0,23	1,68	0,31	226,70	79,4	22,7	534,2
G.E.	0,16	1,84	0,22	1,58	0,32	228,04	78,0	17,7	522,2
I.M.	0,18	1,80	0,32	1,73	0,37	227,86	82,1	23,9	477,0

Huiming et al. (1993) ao inocularem gérbera com *Glomus intrradixi*, *Glomus vesiculiferum* constataram que o peso da matéria seca foi significativamente maior do que o peso obtido pela testemunha.

Huiming et al. (1993) ainda observaram altas concentrações de fósforo nas folhas de gérbera inoculadas. Declerck et al. (1993) ao testaram banana micropropagada inoculadas com *Glomus mosseae* e *Glomus geosporum*, também, encontraram matéria seca da parte aérea significativamente maior nas plantas inoculadas do que na testemunha, além de maior peso de matéria fresca da raiz. Para gérbera de vaso Clone II e 800X os inoculados apresentaram maior matéria fresca de raiz do que a testemunha. Assim como Huiming et al. (1993), Declerck (1993) também constatou aumento de P no tecido das folhas. Segundo Hayman (1983) raízes micorrizadas possuem um sistema de absorção mais eficiente que raízes não micorrizadas, caracterizado por alta V_{max} e baixo K_m , principalmente em plantas crescendo com baixa concentração de fósforo disponível. Dados similares foram obtidos neste experimento.

Além de P outros minerais também apresentaram concentrações superiores quando inoculados com algum fungo MVA. O Nitrogênio para o Clone II apresentou maiores concentrações nas plantas inoculadas, concordando com Hamel, Furlan e Smith (1991) que cita que a micorriza ajuda na transferência do Nitrogênio para planta em leguminosas. Kessel, Singleton e Hoben (1985) também cita transferência do nitrogênio da soja para o milho através de micorrizas vesículo arbuscular.

Jayachandran, Schwab e Hoben (1992) estudando o *Glomus etunicatum* constataram que plantas micorrizadas são maiores e possuem concentrações do P total maiores do que plantas não micorrizadas.

No presente estudo também, foi constatado que para os Clone II e 800X a testemunha apresentou o menor comprimento. A *Gigaspora margarita* apresentou menor matéria seca aos 30 dias para o Clone II e para o Clone 800X apresentou junto com a testemunha os menores resultados em peso da matéria fresca e seca da parte aérea, matéria fresca da raiz, comprimento da parte aérea e número de raízes, indicando uma certa especificidade de hospedeiro.

Essa especificidade Corsato et al. (1993) também observaram entre cultivares de morangueiro e verificaram que, plantas micorrizadas apresentaram, também, maior número de folhas, maior comprimento e maior produção de massa de matéria seca da parte aérea.

Apesar da *Gigaspora margarita* apresentar na maioria das avaliações os menores valores junto com a testemunha ela apresentou a maior percentagem de colonização para o Clone II, o que indica uma baixa eficiência deste fungo em gérbera. Já para o Clone 800X o inóculo múltiplo teve a maior percentagem de colonização seguido da *Gigaspora margarita*. Isto mostra

que o inóculo múltiplo reuniu as características positivas dos fungos, a alta colonização da *G. margarita* e eficiência dos demais.

Segundo Silveira (1992) a micorriza, na maioria dos casos, estimula o crescimento vegetal, como uma consequência de seu efeito sobre a nutrição mineral da planta. A simbiose não aumenta a biomassa vegetal, como também a proporção parte aérea e raiz. O estímulo da captação de nutrientes e posterior translocação à parte aérea causa menor transferência de fotossintatos à raiz e maior retenção deles na parte aérea, sendo utilizado na produção de matéria verde. Dessa maneira, Silveira (1992) citam como consequência a relação peso da matéria seca da parte aérea/peso da matéria seca da raiz ser mais elevada em plantas micorrizadas, isto se observou no Clone 800X (Tabela 13).

TABELA 13. Relação Peso de Matéria seca da parte aérea/peso de matéria seca de raízes de gerbera de vaso Clone 800X submetidos aos tratamentos com fungos MVA (*Gigaspora margarita*, *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum*, e inóculo múltiplo) ESAL, Lavras - MG, 1994.

Clone 800X	PMSPA/PMSR
Teste	0,73
Gig. M	1,52
G.C.	2,07
G.E.	1,82
I.M.	1,63

6.4 CONCLUSÕES

Para o Clone II na maioria das avaliações os tratamentos inoculados com fungos MVA foram superiores à testemunha sendo que aos 30 dias, o *Glomus clarum* foi superior para o

incremento de biomassa e número de folhas. Dentre os inóculos testados, a *Gigaspora margarita* apresentou na maioria das avaliações resultados inferiores aos demais.

Na maior parte das avaliações realizadas para o Clone 800X *Gigaspora margarita* apresentou também resultados inferiores. Dos inóculos, a mistura dos três (*Gigaspora margarita*, *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum*) apresentou os melhores resultados para matéria seca da parte aérea, número de folhas, peso de matérias fresca de raízes e número de raízes.

Para ambos os clones, os inoculados apresentaram maior absorção de nutrientes principalmente N, P, Ca, Mg e Cu em relação a testemunha.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADLEY, R.; BURTA, A.J.; READ, D.J. Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*. *Nature*, New York, v.292, p.335-337, 1981.
- COOPER, K.M.; IINKER, P.B. Translocation and transfer of nutrients, in vesicular-arbuscular mycorrhizas II Uptake and translocation of phosphorus, zinc and sulphur. *New Phytologist* Cambridge, v.73, p.901-993, 1978.
- CORSATO, C.E.; ROMANI, V.L.M.; OLIVEIRA, E.T.; CROCOMO, O.J. Aclimação de plantas de morangueiro micropropagadas utilizando-se fungos endomicorrizicos. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, Brasília, 1993. **Programa e Resumos...**, Brasília: EMBRAPA, 1993. p.160.
- DECLERCK, S.; DEVOS, B.; DELVAUX, B.; PLENCHETTE, C.; STRULLU, DESIRE. Comparative effects of two strains of VAM on growth and nutrition of micropropagated banana plants (*Musa acumunata* Cola c.v. *Giant cavendish*). In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAL, 9, Ontário, 1993. **North Abstracts...**, Ontario, 1993. p.81.
- DHILLION, S.S. Host Endophyte specificity of vesicular - arbuscular mycorrhizal colonization of *Oryza sativa* L. at the pré-transplant stage in low or high phosphorus soil. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v.24, n.5, p.405-411, 1992.

- DUCK, T.A.; VISSER, P.; ERNEST, W.H.O.; SCHAT, H. Vesicular-arbuscular mycorrhizae decrease zinc toxicity to grasses in zinc polluted soil. **Soil Biology & Biochemistry**. Oxford, v.18, p.331-333, 1986.
- GIOVANETTI, M.; MOSSE, B. An evolution of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **The New Phytologist**, London, v.84, n.6, p.489-500, 1980.
- HAMEL, C.; SMITH, D.L. Interspecific N - transfer and plant development in a mycorrhizal field - growth mixture. **Soil Biology & Biochemistry**. Oxford, v.23, n.7, p.661-665, 1991.
- HAMEL, C.; FURLAN, V.; SMITH, D.L. N₂ fixation and transfer un a field grown mycorrhizal corn and soybean intercrop. **Plant and Soil**. The Hague, v.133, n.2, p.177, June, 1991.
- HAYMAN, D.S. The physiology of vesicular and arbuscular endomycorrhizal symbiosis. **Canadian Journal of Botanic**, Ottawa v.61, p.944-963, 1983.
- HEGGO, A.; ANGLE, J.S. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.22, n.2, p.865-869, 1990.
- HUIMING, W.; PARENT, S.; DUVAL, A.; GOSSELIN, A.; DESJARDINS, Y. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza (VAM) on micropropagated gerbera fern and miniature rose plant tests. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRIZAE, 9, Ontario, 1993. **Abstracts...** Ontário, 1993. p.86.
- JAYACHANDRAN, K.; SCHWAB, A.P.; HETRICK, B.A.D. Mineralization of organic phosphorus by vesicular - arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology & Biochemistry** Oxford, v.24, n.9, p.897-903, 1992.
- KESSEL, V.C.P.; SINGLETON, P. W.; HOBEN, H. J. Enhanced N-transfer from a soybean to maize by vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi. **Plant Physiology**, Washington, v.79, p.562-563. 1985.
- KILLHAM, K.; FIRESTONE, M.K. Vesicular arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acidic and heavy metal depositions. **Plant and Soil**, The Hague, v.72, p.39-48, 1983.
- KOOMEN, I.; McGRATH, S.P. Mycorrhizal infection of clover is delayed in soil contaminated with heavy metals from past sewage sludge applications. **Soil Biology & Biochemistry** Oxford, v.22, n.6, p.871-873, 1990.
- LIN, M.T.; MATOS, M.A.M.; ASSIS, M.; CABEL, R. Alta dependência endomicorrizica de plântulas micropropagadas de pera. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 2, São Paulo, 1987. **Programa e Resumo...** São Paulo: USP, 1987a. p.11-12.

- LIN, M.T.; MATTOS, M.A.M. ASSIS, M.; CABEL, R. Influência de inoculantes endomicorrizoccos no desenvolvimento de porta-enxerto micropropagados de macieira MM 106 em dois substratos. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 2, São Paulo 1987. **Programa e Resumo...** São Paulo: USP, 1987b. p.10-11.
- LOPES, E.S.; SIQUEIRA, J.O.; ZAMBOLIM, L. Caracterização das micorrizas veisuculares (MVA) e seus efeitos no crescimento das plantas. Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.7, n.1, p.7-19. 1983.
- SALLANOW, H.; FORT, M.; COUDRET, A. The ultrastructure of micropropagated and greenhouse rose plant stomata. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.32, p.227-233, 1993.
- SATO, Y.; PINTO, J.E.B.P.; OLIVEIRA, E. de. Efeito do fungo endomicorrizico (*Glomus clarum*) no desenvolvimento da mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) micropropagada. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA ESAL, 1, Lavras, 1986. **Anais...** Lavras ESAL, 1986. p.01-38.
- SESTAK, Z.; CATSKY, J.; JARVIS, P.G. In: SESTAK, Z.; CATSKY, J.; JARVIS, P.G. (ed.) **Plant photosynthetic production manual of methods**. Netherlands: Zuid-Nederlandsche Drukkerij N.V., 1971. p.818.
- SILVA, L.R.C.; ARELLO, E.F.; SILVA, M.A. Efeito de fungos micorrizicos vesículo arbusculares sobre o desenvolvimento de mudas micropropagadas de *Gerbera jamesonii*. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 4, Mendes, 1991. **Anais...** Mendes CNPDS/UFRRJ, 1991. p.151.
- SILVEIRA, A.P. Micorrizas. In: ELKE, J.B.W.; CARDOSO, Sui M. Isai; NEVES, M.C.F. (coord.). **Microbiologia do solo**. Campinas: SSCS, 1992. p.257-282.
- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. Biotecnologia do solo: Fundamentos e perspectivas. In: SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Ciências Agrárias nos Trópicos Brasileiros**. Brasília: Ed. MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 1988. p.125-166.
- SIQUEIRA, J.O. Micorrizas: Forma e função. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1, Lavras, 1985. **Anais...** Lavras: ESAL, 1985. p.5-29.
- St. JOHN, T.V.; COLEMAN, D.C.; REID, C.P.P. Association of vesicular - arbuscular mycorrhizae hyphae with soil organic particles. **Ecology**, Dunham, v.64, p.957-959, 1983.

APÊNDICE

TABELA 1A. Resumo do quadro de análise de variância para peso das matérias fresca e seca da parte aérea $\log(x+10)$, peso das matérias fresca e seca de raiz $(x+5)$, número de brotos e folhas $(x+5)$, comprimento da parte aérea $\log(x+10)$ e número de raízes $(x+5)$ do Clone II.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados Médios							
		Matéria fresca		Matéria seca		Nº de Brotos	Nº de Folhas	Comprimento da P. aérea	Nº de Raízes
		Raiz	P. aérea	Raiz	P. aérea				
BAP (A)	1	0,002336**	0,00973**	0,0000160**	0,000789**	22,2624**	25,4249**	0,1672**	0,5744**
Nitrato de Amônio (B)	5	0,000131	0,00079*	0,0000009	0,000054**	0,3260*	0,6186	0,0024*	0,0103
A X B	5	0,0001325	0,00044	0,0000008	0,0000095**	0,3567*	0,4989	0,0006	0,0102
Resíduo	48	0,0000823	0,00023	0,0000009	0,0000117	0,1077	0,2765	0,00078	0,0050
C.V. %	-	0,405	0,654	0,148	0,135	10,713	13,245	1,12	3,044

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F

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

TABELA 2A. Resumo do quadro de análise de variância para peso da matéria fresca e seca da parte aérea comprimento da parte aérea, e número de folhas do Clone III, dados não transformados.

Fontes de variação	G.L.	Quadrados Médios			
		Peso Mat. fresca P. aérea	Peso Mat. seca P. aérea	Comprimento p. aérea	nº de folhas
BAP (A)	1	29,0605**	0,1180**	11,210**	7040,4365**
Nitrato de Amônio (B)	6	0,230079*	0,0050	4,622**	196,5837**
A X B	6	0,3284**	0,0027	4,587**	271,1985**
Resíduo	84	0,1049	0,0059	1,322	23,666
C.V. %	-	37,896	163,698	44,25	44,70

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

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

TABELA 3A. Resumo do quadro de análise de variância para peso da matéria fresca e seca da parte aérea, comprimento da parte aérea e número de folhas do Clone 800X, dados não transformados.

Fontes de variação	G.L.	Quadrados Médios			
		Peso Mat. fresca parte aérea	Peso Mat. seca parte aérea	Nº folhas	comprimento parte aérea
BAP (A)	1	6,1989**	0,0072169**	18452,680**	8,1656**
Nitrato de Amônio (B)	6	0,0985	0,0002917**	303,5787**	0,8828**
A X B	6	0,0791	0,0001301	251,5841**	0,2931**
Resíduo	70	0,0555	0,000069	60,7293	0,05729
C.V. %	-	53,131	35,64	35,826	13,501

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

TABELA 4A. Resumo do quadro de análise de variância do peso fresco e seco da parte aérea, número de brotos e de folhas e comprimento da parte aérea para o Clone II, dados não transformados.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados Médios				
		Peso fresco P.A.	Peso Seco P.A.	Nº Brotos	Nº Folhas	Comp. P.A.
TDZ	5	0,05107**	0,0103687**	5,3096**	51,366**	3,7839**
Resíduo	18	0,00489	0,0009663	0,1469	4,6988	0,1274
CV (%)	-	14,96	-	16,54	34,041	23,508

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 5A. Resumo do quadro de análise de variância do peso das matérias fresca e seca da parte aérea, número de brotos e de folhas e comprimento da parte aérea para o Clone 800X, dados não transformados.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados Médios				
		Peso fresco P.A.	Peso Seco P.A.	N ^o Brotos	N ^o Folhas	Comp. P.A.
Nitrato de Amônio/no TDZ	5	0,7794**	0,0005020**	3,1447*	286,519**	0,4549**
Resíduo	24	0,1230	0,0000713	1,0426	44,658	0,05966
CV (%)	-	23,856	17,687	18,169	16,16	10,038

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F

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

TABELA 6A. Resumo do quadro de análise de variância do peso da matériaS fresca e seca, e comprimento da Parte Aérea (x+5) do Clone II.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados médios		
		Peso Mat. fresca P.A.	Peso Mat. seca P.A.	Comprimento P.A.
Filtro amarelo	1	0,015085	0,0000370	0,2340**
Resíduo	20	0,18389	0,0007532	0,03394
CV		14,36	1,203	6,68

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

TABELA 7A. Resumo do quadro de análise de variância do peso da matéria fresca e comprimento da parte aérea (x+5) do Clone III.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados médios	
		Peso Mat. fresca da P.A.	Comprimento da P.A.
Filtro Amarelo	1	0,0022	0,0932
Resíduo	22	0,1874	0,0459
CV	-	13,514	7,99

TABELA 8A. Resumo do quadro de análise de variância do peso da matéria fresca da parte aérea (x+5) do Clone 800X.

Fontes de variação	G.L.	Quadrados médios	
		Peso fresco	Peso seco
Filtro Amarelo	1	0,01508	0,0000156
Resíduo	20	0,1838	0,0000350
CV	-	14,364	-

TABELA 9A. Resumo do quadro de análise de variância de número de plantas enraizadas, vitrificadas, número de raízes/planta, comprimento de raiz (x+5).

Fontes de variação	G.L.	Quadrados médios			
		Plantas enraizadas	Número de vitrificadas	Raízes/planta	Comprimento de raiz
ANA e IBA	6	0,03398	0,0290	0,24339	0,3218*
Resíduo	56	0,01707	0,0148	0,11937	0,1306
CV 13,973	-	13,973	11,304	29,109	27,113

TABELA 10A. Resumo do quadro de análise de variância do número de folhas, raízes, raízes fasciculadas, comprimento da parte aérea e raiz (x+5).

Fontes de variação	G.L.	Quadrados médios				
		Folhas	Nº de raízes	Raízes fasciculada	Comprimento P.A.	Raiz
AIA	8	1,3038**	5,4787**	1,86600**	0,5773**	1,2259**
Resíduo	72	0,45045	0,7016	0,4244	0,07383	0,1055
CV	-	25,30	36,756	52,652	11,15	22,33

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 11A. Resumo do quadro de análise de variância do peso da matéria fresca e seca da parte aérea e raiz, comprimento da parte aérea e raiz, nº de folhas e raízes (x+5) do Clone 800X.

Fontes de	G.L.	Quadrados médios							
		Matéria fresca		Matéria seca		Comprimento		Número	
		P.A.	Raiz	P.A.	Raiz	P.A.	Raiz	Folhas	Raízes
Micorrizas	4	0,7509**	0,1352**	0,0657**	0,0193	0,5874**	0,2097**	0,9663**	0,5252**
Resíduo	25	0,0320	0,03037	0,00194	0,0192	0,05993	0,0885	0,1188	0,1207
CV	-	15,477	19,160	10,94	38,74	9,33	8,81	10,64	10,348

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

TABELA 12A. Resumo do quadro de análise de variância de peso de matérias fresca e seca da parte aérea, peso de matéria fresca da raiz, número de folhas, raízes, comprimento da raiz, área foliar específica e porcentagem de colonização do Clone II aos 30 dias.

Fontes de variação	G.L.	Quadrados Médios							
		Peso Fresco		Peso Seco	Nº		Comp.	Área	†
		P.aérea	raiz	P.aérea	Folha	raiz	raiz	foliar	colonização
Micorrizas	3	0,1977*	0,04739	0,00194	46,098	4,432	2,20833	0,9064	3174,6822**
Resíduo	12	0,041	0,0131	0,00037	14,223	1,838	1,2822	0,4042	90,4010
CV	-	24,40	21,28	21,39	23,25	17,28	18,45	14,04	18,957

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

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

TABELA 13A. Resumo do quadro de análise de variância de peso da matéria fresca e seca das folhas e do pecíolo, peso de matéria fresca da raiz, número de folhas, raízes, comprimento da raiz e porcentagem de colonização do Clone II aos 60 dias.

Fontes de variação	G.L.	Quadrados Médios							
		Peso Fresco		Peso Seco		N ²		Comp.	Área
		P. aérea	raiz	P. aérea	Folha	raiz	raiz	foliar	
Micorrizas	3	1,5699**	2,0846**	0,02615**	48,2473	15,0572*	19,7049**	1077,8982**	
Resíduo	12	0,1148	0,1588	0,00329	19,9764	4,1093	2,1412	42,4087	
CV	-	19,461	22,088	32,09	23,347	18,91	14,74	15,711	

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

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

TABELA 14A. Resumo do quadro de análise de variância de peso de matéria fresca e seca da parte aérea e raiz e número de folhas do Clone II aos 90 dias.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados Médios				
		Peso Mat. Fresca		Peso Mat. Seco		N ² de folhas
		P.A.	raiz	P.A.	raiz	
Micorrizas	3	6,6228*	0,9720	0,01474	0,01774	92,166
Resíduo	12	1,7824	0,5249	0,01496	0,01326	29,083
CV	-	8,863	14,541	7,276	24,7	11,062

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