UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CULTIVO *IN VITRO* DE GLOXÍNIA *Sinningia speciosa* (LOOD) HEIRN

Luciana Nogueira Londe

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Setembro 2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CULTIVO *IN VITRO* DE GLOXÍNIA *Sinningia speciosa* (LOOD) HEIRN

Luciana Nogueira Londe

Profa. Dra. Ana Maria Bonetti
Orientadora

Profa. Msc. Alcione da Silva Arruda
Co - Orientadora

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Setembro 2002

DEDICO

A meus pais Anésio e Regina, agradeço pelo amor e confiança em meu potencial.

Aos meus irmãos Fernanda e Marcelo, pela amizade e carinho.

A meu namorado Adilson, pelo companheirismo e paciência nesses anos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CULTIVO *IN VITRO* DE GLOXÍNIA *Sinningia speciosa* (LOOD) HEIRN

Luciana Nogueira Londe

Aprovado Pela Banca examinadora Em 09/09/02 Nota 100

Profª. Dra. Ana Maria Bonetti
Orientadora

Profª. Msc. Alcione da Silva Arruda
Co - Orientadora

Prof. Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo

Universidade Federal de Uberlândia
Profª. Drª. Ana Angélica Almeida Barbosa
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia, 12 de Setembro de 2002.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar pelos caminhos já percorridos e aqueles em que ainda caminharei.

A Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

À Profª. Dra. Ana Maria Bonetti e Profª. Msc. Alcione da Silva Arruda pela orientação.

Às estagiárias do Laboratório de Cultura de Tecido Vegetal (Adelaide, Elisângela e Gláucia) pelo companheirismo na realização do trabalho.

A Universidade Federal de Lavras por ter cedido o material para a realização do experimento.

À Profª. Dra. Denise Garcia Santana pelo auxílio nas análises estatísticas.

A Marlus e Mário do Laboratório de Fitopatologia da UFU pela análise microbiológica dos materiais contaminados.

À 49ª turma de Ciências Biológicas pelos anos de convivência e aprendizado.

RESUMO

Foi analisada a concentração adequada do meio de cultura MS para o cultivo *in vitro* de *Sinnngia speciosa* (gloxínia) em escala comercial, variando as concentrações de reguladores de crescimento (6 – benzilaminopurina – BAP e ácido naftaleno acético – ANA) além de serem identificados os principais patógenos existentes na cultura dentre eles fungos, bactéria e levedura.

O cultivo *in vitro* da gloxínia foi feito a partir de matrizes doadas pela Universidade Federal de Lavras, as quais foram submetidas a repicagens e, posteriormente, aos tratamentos testando-se as concentrações 0,00; 0,40; 0,80; 1,60 mgL^{-1}de BAP em combinação com ANA nas concentrações 0,00; 0,50; 0,75; 1,25 mgL^{-1}, para os meios MS 50% e 100%. O experimento foi instalado em esquema fatorial, com delineamento inteiramente casualizado e 5 repetições. O enraizamento foi melhor em meio MS 50%, enquanto que em meio MS 100% se obteve maior número e comprimento das brotações. A presença de calos foi observada quando se adicionou auxina aos meios e não houve perda de plântulas por contaminação ou por não diferenciação tissular.

Palavras-chave: *Sinningia speciosa*, micropropagação, planta ornamental.

ÍNDICE

1. Introdução 01

1.1. A cultura de tecidos 01

1.2. A contaminação na cultura de tecido vegetal 03

1.3. O mercado de flores brasileiro 04

1.4. A gloxínia (*Sinningia speciosa*) 05

2. Material e Métodos 08

2.1. Fase Laboratorial 08

2.2. Delineamento experimental 08

2.2.1. Matrizes de Floricultura 09

2.2.2. Matrizes doadas pela UFLA 10

2.3. Caracteres avaliados 13

3. Resultados e Discussão 14

3.1. Instalação de plântulas a partir de plantas comerciais 14

3.2. Gloxínias *in vitro* inoculadas em meio MS com fitorreguladores de crescimento 16

4. Conclusões 27

5. Referências Bibliográficas 29

LISTA DE TABELAS

1. Composição do meio de cultura MURASHIGE & SKOOG 100% (1962).....12
2. Contaminantes e percentual de amostras contaminadas em cultivo *in vitro* de gloxínia. UFU. Uberlândia/ MG. 2002.....15
3. Número de brotos e raízes de gloxínia produzidos, *in vitro*, em diferentes tratamentos. UFU. Uberlândia/MG. 2002.....17
4. Altura de brotos, *in vitro*, em diferentes concentrações de meio de cultura, variando quantidades de ANA e BAP. UFU. Uberlândia/MG. 2002.....24
5. Número de calos, totais por tratamento, em explantes de gloxínia cultivados em meio MS 50% contendo ANA e BAP em diferentes concentrações (mgL^{-1}). UFU. Uberlândia/MG. 2002.....25
6. Número de calos, totais por tratamento, em explantes de gloxínia cultivados em meio MS 100% contendo ANA e BAP em diferentes concentrações (mgL^{-1}). UFU. Uberlândia/MG. 2002.....26

LISTA DE FIGURAS

1. Número de raízes crescidas em meio MS 50% com diferentes concentrações de ANA. UFU. Uberlândia/MG. 2002.....18
2. Número de raízes de gloxínia crescidas em meio MS 100% variando concentrações de ANA. UFU. Uberlândia/MG. 2002.....19
3. Número de brotos crescidos em diferentes concentrações de BAP. UFU. Uberlândia/MG. 2002.....20
4. Número de brotações de gloxínia em meio MS 50% em concentrações diferenciadas de ANA. UFU. Uberlândia/MG. 2002.....21
5. Altura de brotos em meio MS 50% variando as concentrações de BAP em combinação com ANA. UFU. Uberlândia/MG. 2002.....22
6. Altura das brotações de gloxínia em meio MS 50% variando-se as concentrações de ANA e BAP. UFU. Uberlândia/MG. 2002.....22
7. Altura de brotos de gloxínia em meio MS 100%, variando-se as doses de BAP e ANA. UFU. Uberlândia/MG. 2002.....23

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Cultura de Tecidos

A Cultura de Tecido Vegetal pressupõe técnicas que visam obter plantas a partir de explantes, os quais podem ser meristemas, partes da folha, raízes, caules, anteras ou protoplastos. Essa técnica baseia-se na totipotência celular, isto é, na capacidade de uma célula qualquer da planta regenerar uma nova planta, visto que possui toda a informação genética necessária para tal (MANTELL *et al.*, 1994), além disso, segundo HERNANDÉZ & RUBIO (2002) essa técnica permite a reprodução de plantas em condições totalmente assépticas a partir de um número pequeno de segmentos de um tecido, regenerando-se uma grande quantidade de plantas geneticamente iguais à planta matriz, em um meio de cultura. Portanto, a propagação por cultura de tecidos, por meio da micropropagação, é um sistema importante para os programas de melhoramento, já que possibilita a produção em massa de

clones considerados superiores (BRAGA *et al*., 1997) e, em âmbito comercial, a importância deve-se ao fato de manter o material livre de doenças e de acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa (TORRES *et al*,1998).

Para o sucesso na propagação *in vitro,* é necessário controlar variáveis como a composição do meio de cultura e a origem dos explantes utilizados e, também, das condições físicas ambientais (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

O meio de cultura onde se inoculam os explantes pode conter reguladores de crescimento ou fitohormônios, substâncias que regulam, *in vitro,* o comportamento da planta (RIBEIRO, 1999). Os reguladores de crescimento são substâncias orgânicas, que apresentam como função básica ação sobre o crescimento e alguns tipos de organogênese. Os principais grupos são as auxinas e citocininas. Dentre as auxinas, destaca-se o Ácido indol - 3 - butírico (AIB) e o Ácido 2, 4 - diclorofenoxiacético (2,4 - D) e as citocininas mais usadas são a 6 - benzilaminopurina (BAP) e a Cinetina (KIN). O Thidiazuron (TDZ) é um regulador de crescimento, derivado de uréia, sendo de composição química *N*-phenil-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-iluréia, com estrutura sem anel purínico, ao contrário do que acontece nas citocininas. Inicialmente este composto foi registrado como desfolhante de algodão e, mais recentemente, como tendo ação citocinínica, sendo cada vez mais usado no cultivo *in vitro* (ANDRADE, 1998).

A diferença das técnicas tradicionais de cultivo com a propagação *in vitro* é que a última permite uma propagação de grandes volumes de plantas em menor tempo, em um espaço reduzido (HERNANDÉZ & RUBIO,2002).

Desde o início do século, a propagação de plantas *in vitro* tem atraído pesquisadores, que utilizam as técnicas de cultura de tecidos vegetais (TORRES *et al*.,1998) que são

ferramentas importantes para solucionar problemas fitossanitários, que ocorrem com a propagação e o melhoramento genético de plantas (PARANHOS *et al.*, 1996).

Na floricultura, a cultura de tecidos vegetais começou a ser empregada, segundo ARRUDA (1996) para a multiplicação de espécies ornamentais, objetivando:

1) Produzir plantas axênicas (livres de doenças),
2) Produção rápida de grande número de plantas geneticamente idênticas (clones),
3) Introdução de novas variedades e/ou genótipos,
4) Manter genótipos de diferentes espécies como reserva.

1.2. A contaminação na cultura de tecido vegetal

Segundo DEBERGH & ZIMMERMAN (1991) um grande problema da micropropagação é o índice de contaminação que pode ser resultante das próprias matrizes ou do manuseio em laboratório. Assim, muitos pesquisadores, como HERMAN (1996), se preocupam com a detecção, identificação e caracterização de contaminantes na cultura de tecidos vegetais, tentando controlá-la e, até mesmo, discutindo o papel desses microrganismos na micropropagação.

A interação entre plantas e microrganismos pode atuar estimulando o crescimento vegetal, seja por competição com patógenos ou por indução de efeitos de outros microrganismos úteis, com benefício às plantas (ARRUDA, 2000). Em contrapartida, DEFOSSARD (1985) mostrou que para o cultivo, *in vitro*, todo contaminante existente é potencialmente prejudicial à planta, assim faz-se necessária uma esterilização rigorosa para se alcançar os objetivos propostos na micropropagação. Nesse sentido, as pesquisas contribu-

em para a identificação de "vitropatógenos", visando a eliminação radical dos microrganismos. Dentre as técnicas utilizadas pode-se apontar a radiação a laser, o tratamento com água corrente, água quente, a dupla desinfecção, a desinfecção interna, o uso de antibióticos no meio de cultura, a termoterapia, a quimioterapia e o uso de múltiplos procedimentos (HERMAN, 1996).

Uma outra maneira de se identificar microrganismos endógenos é pelo "screening" dos contaminantes, expondo os explantes à meios de cultura que favoreçam sua multiplicação *in vitro* e, posteriormente, eliminando-os das culturas contaminadas para depois, iniciar o cultivo (ARRUDA, 2000). Segunda a mesmo autora, os antibióticos e fungicidas são, ocasionalmente, utilizados para o controle *in vitro* de patógenos. Entretanto, o uso de antibióticos tem sido limitado devido à grande toxicidade para as células de plantas. Quanto às contaminações fúngicas, THOMSON (1993) cita o benomyl, nome comercial benlate (metil –1 butilcarbomoil – 2 – benzimidazol – carbamato) como o mais utilizado fungicida foliar sistêmico, que não apresenta problemas de toxidez, desde que as recomendações de uso sejam respeitadas. Esse produto impede a reprodução de alguns fungos, embora algumas espécies tolerantes possam ser selecionadas.

1.3. O mercado de flores brasileiro

O mercado de flores movimenta 750 milhões de dólares por ano, nos Estados Unidos (SILVA, 1995). A partir da década de 60, a floricultura ganhou espaço econômico no Brasil. Um grande impulso foi dado com a criação da Cooperativa Agropecuária Holambra, em 1948, sendo que os principais focos de comercialização estão nos grandes centros

como São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Brasília, Porto Alegre, Curitiba, Salvador, Recife, Vitória e Manaus (CASTRO & MIRIAM, 1988). No Brasil havia falta de flores no mercado interno, resultando em diminuição nas exportações e aumento das importações da Bolívia, Chile e Colômbia. Esses três países passaram a exportar 73.82% de flores nos anos de 1993 a 1994, aumentando a renda de 978 mil para 1.7 milhões de dólares (SILVA,1995). A baixa taxa de exportação de flores do Brasil vem mudando, principalmente no estado de Alagoas, que viu a exportação de flores tropicais aumentar de 845 dólares em 2000, para 108 mil dólares desde julho de 2001, período em que os ingleses descobriram a variedade e beleza de nossas flores. A Associação dos Produtores de Flores Ornamentais do Estado de Alagoas (AFLORAL) tem o objetivo de em 2002, colocar no mercado externo 400 mil dúzias de flores, elegendo as flores tropicais como primeiro produto de seu Programa Especial de Exportação (VERÍSSIMO, 2001).

1.4. A Gloxínia (Sinningia speciosa)

Uma das espécies originárias do Brasil é a gloxínia [*Sinningia speciosa* (Lood) Hiern], planta que pertence à família Gesneriacea. A gloxínia é uma planta tuberosa, com folhas pilosas, possuindo flores em forma de campânula de aproximadamente 10cm de diâmetro, florescendo no final da primavera e verão. Para seu desenvolvimento é necessário temperatura entre 14-15°C e pH de 6.0 a 6.3, dependendo do substrato utilizado. Sua fertilização, por m², requer: 10g de nitrato de potássio, 30g de fosfato de potássio e 10g de sulfato de amônio (ONIS,1975).

A multiplicação dessa espécie ocorre durante os meses de dezembro a fevereiro, em locais com temperatura de 20-22°C. Em três semanas, pode-se realizar o primeiro repicado e um mês mais tarde, o segundo. A forma assexual de multiplicação consiste em colocar as plantas em banquetas de cultivo para que, no fim do verão, tubérculos de 3 a 6 cm de diâmetro possam ser obtidos; a multiplicação pode ser feita, ainda, por estacas (VILARNAU & GUARRO, 1974).

A regeneração de plantas de gloxínia por meio do cultivo *in vitro* é realizada utilizando-se segmentos de tecidos foliares e inoculação em meio M&S (MURASHIGE & SKOOG – 1962) suplementado de fitorreguladores de crescimento (HERNANDÉZ & RUBIO, 2002). Segundo JOHNSON (1978) o número de plantas que pode ser produzido com apenas uma folha é bem maior quando comparado com a utilização de raízes ou caules. Uma vez enraizadas, *in vitro*, as plântulas passam por um processo de aclimatação, sendo que características como umidade, iluminação e temperatura devem ser controladas semelhante às condições laboratoriais para, posteriormente, terminar seu ciclo em casa de vegetação.

No Brasil, o mercado de flores está em expansão, portanto, uma maior produção em escala comercial se faz necessária, uma vez que existe crescente demanda para flores ornamentais. Nesse sentido, o cultivo *in vitro* poderá auxiliar na expansão de mercado , uma vez que uma alta produção de plantas em período mais rápido pode ser obtida, quando comparado à produção convencional, com a vantagem de serem produzidas plantas livres de patógenos .

Além disso, pode-se contribuir para o aumento da taxa de exportação de plantas ornamentais brasileiras, já que a cultura de tecidos é uma alternativa viável nos programas de

produção, além de ser uma espécie nativa do Brasil, bastante apreciada por sua flor e de considerável comercialização no mercado de flores.

O presente trabalho analisou a concentração adequada do meio de cultura M&S (MURASHIGE & SKOOG – 1962) para o cultivo, *in vitro,* de *Sinningia speciosa* (Lood) Hiern em escala comercial, variando concentrações de reguladores de crescimento (BAP-6-benzinaminopurina e ANA – ácido naftaleno acético) além de identificar os principais patógenos existentes na cultura de tecido dessa espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fase Laboratorial

Os experimentos de cultivo de tecido foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecido Vegetal do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia e a identificação dos microrganismos foi realizada no Laboratório de Fitopatologia Instituto de Ciências Agrárias/UFU.

2.2. Delineamento experimental

Foram realizados dois experimentos sendo que o primeiro consistiu na instalação das plântulas a partir de matrizes adquiridas em floricultura e o segundo a partir de plântulas, *in vitro* ,doadas pela Universidade Federal de Lavras.

2.2.1. Matrizes obtidas de Floricultura

Vasos de gloxínia em fase de florescimento, adquiridos em floricultura, foram mantidos em Casa de Vegetação da Universidade Federal de Uberlândia - UFU. Desses vasos, foram retiradas folhas da gloxínia de, aproximadamente, o mesmo comprimento e idade, sendo que foram utilizadas, preferencialmente, as folhas jovens.

As folhas de gloxínia foram pulverizadas a cada 15 dias com solução de benlate (metil –1 butilcarbomoil – 2 – benzimidazol – carbamato) 0,02 mgL^{-1}, antes de serem utilizadas em laboratório. Essas folhas foram excisadas em casa de vegetação com o auxílio de um bisturi e colocadas em recipiente contendo papel de filtro umedecido com água destilada para evitar a dessecação. No laboratório de Cultura de Tecido Vegetal, as folhas foram submetidas ao processo de desinfecção para a obtenção de plantas axênicas, doadoras de explantes. Para desinfecção as folhas são lavadas em água corrente e, posteriormente enxaguadas em água destilada. São, então, imersas em álcool 96°GL 1:1 por 45 segundos e em seguida, em solução de hipoclorito de sódio 50%, com 2% de cloro ativo, por 3 minutos sob constante agitação, seguido de três lavagens consecutivas em água destilada autoclavada. Com auxílio de tesoura autoclavada, retira-se segmentos foliares de, aproximadamente, 0,5 cm^2 e inocula-se em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio M&S para a instalação das folhas. Após a inoculação dos segmentos foliares é feita a transferência para câmara de crescimento com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas.

Coloca-se um explante em cada tubo de ensaio, o que passa a constituir uma unidade experimental. Foram inoculados um total de 437 explantes num período de 120 dias. Uma amostra de 88 explantes foi selecionada, aleatoriamente, para análise microbiológica no Laboratório de Fitopatologia ICIAG/UFU.

2.2.2. Matrizes doadas pela Universidade Federal de Lavras - UFLA

Para definição da melhor metodologia a ser utilizada, otimizamos protocolos para crescimento *in vitro*, visando o cultivo em escala comercial.

Plântulas da mesma espécie, mantidas *in vitro*, doadas pela UFLA– MG foram repicadas a partir de brotos apicais, em condições estéreis, por duas vezes em meio M&S ϕ 100% (MURASHIGE & SKOOG – 1962), para a produção de matrizes doadoras de explantes sendo que essas foram utilizadas nos tratamentos com reguladores de crescimento, após atingirem a altura de aproximadamente 1,5 cm.

Todos os tubos de ensaio e os meios foram previamente esterilizados em autoclave vertical à temperatura de 121°C, sob a pressão de 1 atm por 20 minutos e a transferência dos explantes foi feita em câmara de fluxo laminar. O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 1$ e distribuiu-se 15 mL de solução em cada tubo de ensaio.

Após 45 dias da segunda repicagem, as gloxínias que mediam aproximadamente 1,5 cm de altura foram selecionadas para que os explantes pudessem ser retirados e submetidos aos tratamentos, com diferentes concentrações do meio M&S: 50% (metade dos nutrientes) e 100% (Tabela 1) em combinação com reguladores de crescimento BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftaleno acético). O BAP foi testado nas concentrações 0; 0,4; 0,8 e 1,6 mgL^{-1} em combinação com o ANA nas concentrações 0; 0,5; 0,75 e 1,25 mgL^{-1}, para ambos os meios de cultura.

Tabela 1. Composição do meio de cultura de Murashige & Skoog 100% (1962).

CONSTITUINTES	QUANTIDADES (mgL^{-1})
INORGÂNICOS	
NH_4NO_3	1650,00
KNO_3	1900,00
$CaCl_2$ 2 H_2O	440,00
$MgSO_4$ 7 H_2O	370,00
KH_2PO_4	170,00
KI	0,83
H_3BO_3	6,20
$MnSO_4$ 2 H_2O	22,30
$ZnSO_4$ 7 H_2O	4,086
$NaMoO_4$ 2 H_2O	25,00
$CuSO_4$ 5 H_2O	2,50
$CoCl_2$ 6 H_2O	2,50
$FeSO_4$ 7 H_2O	27,80
Na_2 EDTA 2 H_2O	37,408
ORGÂNICOS	
Glicina	2,00
Tiamina HCl	0,10
Sacarose	3000,00
Ágar	0,7%
Inositol	100,00
Ácido nicotínico	0,50
Piridoxina HCl	0,50

Brotos apicais e adventícios de plântulas de gloxínia foram excisados com auxílio de bisturi esterilizado e transplantados para os meios M&S 50 e 100%, com as devidas combinações de reguladores de crescimento.

Os explantes inoculados foram mantidos em sala de crescimento com temperatura 26 ± 1°C e fotoperíodo de 16 horas de luz com intensidade luminosa de 2500 lux por 45 dias.

Esse experimento foi instalado em esquema fatorial, com delineamento inteiramente casualizado e 5 repetições por tratamento, sendo um tubo de ensaio com um explante por unidade experimental. Na análise estatística os dados foram transformados em raiz (x+0,5).

2.3. Caracteres avaliados

No primeiro experimento, após 120 dias da instalação das folhas *in vitro,* foram selecionadas amostras aleatórias para verificar os principais patógenos encontrados nos explantes e para análise microbiológica do material.

O índice de contaminação foi estimado em percentagem, considerando o número de explantes contaminados em relação ao total de exlantes inoculados, por tratamento.

No segundo experimento, o número de brotações e raízes foi determinado por contagem realizada em laboratório, após o período de 45 dias de transferência do explante para o meio, sem a retirada do material do recipiente de cultivo, considerando-se brotações de, aproximadamente, 0,05 cm, com raízes adventícia e principal.

O comprimento das brotações foi avaliado em centímetros com o auxílio de régua, considerando-se a altura em relação à inserção da ramificação foliar da brotação à ramificação central da plântula.

A presença de calos e perda de plântulas foi analisada atribuindo-se um (1) para presença de calos e perda de plântulas e zero (0) para ausência de calos e não perda de plântulas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Instalação de plântulas a partir de plantas comerciais.

Durante todo o período de instalação do experimento, *in vitro,* alguns segmentos foliares de gloxínia inoculados não sofreram diferenciação e outros foram contaminados.

Na amostra total, 67,27% dos explantes apresentavam algum tipo de contaminante, identificados como fungos, bactérias e leveduras. Os outros 32,73% não se desenvolveram, apesar de não apresentarem contaminação aparente.

Pela análise fitopatológica de 88 materiais contaminados, selecionados aleatoriamente, constatou-se a predominância de *Fusarium, Penicillium* e *Aspergillus* como contaminantes fúngicos, uma bactéria contaminante não identificada e um tipo de levedura, além da combinação de dois desses microrganismos, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Contaminantes e percentual de amostras contaminadas em cultivo *in vitro* de gloxínia. UFU. Uberlândia/MG. 2002.

Contaminantes	**Percentagem (%)**
Aspergilus	28,41
Bactéria contaminante	6,82
Fusarium	36,36
Fusarium + *Penicillium*	4,55
Levedura	13,64
Penicillium	10,23

A predominância de *Fusarium* e *Aspergilus* pode ser devido à contaminação das matrizes de gloxínia que foram deixadas em casa de vegetação.

No local não há controle dos patógenos que podem atacar as plantas. Várias culturas são armazenadas juntas, propiciando que microrganismos passem de uma planta para outra e mesmo com a desinfestação dessas, em Laboratório, o contaminante foi transferido para o meio de cultura. Com relação à gloxínia, observou-se um "amarelamento" das folhas durante a permanência na casa de vegetação, além do ataque por insetos.

O manuseio inadequado do material inoculado ou dos instrumentos de inoculação, também, são fontes de contaminação, além da presença de esporos de fungos no Laboratório. O *Penicilium* foi responsável pelo não desenvolvimento dos segmentos foliares inoculados.

As bactérias contaminantes que infectaram o meio são provenientes, provavelmente, das matrizes previamente contaminadas em campo e a presença de levedura está relaciona-

da a uma possível fermentação do meio devido à utilização de reagentes armazenados por longo tempo.

A hipótese de que a elevada concentração de hipoclorito de sódio 50% por 3 minutos, 2% de cloro ativo tenha sido a responsável pelo não desenvolvimento dos explantes inoculados foi descartada ao testarmos outras combinações de tempo de exposição e concentração do hipoclorito (30%, 10'; 30%, 5'; 50%, 5'; 50%, 3' e 50%, 2'). Explantes submetidos a concentração mais baixa e por menor período, também, não se desenvolveram.

Logo, persiste a hipótese inicial de que a contaminação das plantas seja a responsável pelo baixo sucesso da micropropagação.

3.2. Matrizes doadas por Lavras inoculadas em meio MS com fitorreguladores de crescimento

Após sucessivas repicagens, as plântulas de gloxínia transplantadas produziram novos brotos em quantidades e tamanhos variáveis e em alguns tratamentos ocorreu a formação de raízes e calos. Não houve perda das plântulas por contaminação ou não diferenciação dos tecidos.

Avaliando-se o número de raízes crescidas, verifica-se que houve a interação da auxina e meio (ANA *MEIO), como mostra a Tabela 3. O melhor meio para o crescimento radicular foi o meio MS 50%, com maior número de raízes em 0,50 mgL^{-1} de ANA, no entanto, elevando-se a concentração da auxina para 1,25 mgL^{-1} no meio MS 100% , houve maior formação de raízes. Nas demais concentrações, o enraizamento foi semelhante em ambos os meios (Tabela 3). OLIVEIRA *et al.* (1993) sugerem uma redução nas concentra-

ções do meio MS para outras espécies ornamentais para o sucesso na micropropagação, entretanto, para a gloxínia ambos os meios propiciam um bom enraizamento.

Tabela 3 : Número de brotos e raízes de gloxínia produzidos, *in vitro,* em diferentes tratamentos. UFU. Uberlândia/MG. 2002.

ANA (mgL^{-1})	Meio MS	Número de brotações	Número de raízes
0,00	50%	1.6457 b	2,7747 a
	100%	7,5012 a	1,7793 a
0,50	50%	7,7473 a	19,5434 a
	100%	11,1134 a	1,6797 b
0,75	50%	13,0096 a	22,8048 a
	100%	9,0235 a	8,9140 a
1,25	50%	9,5234 a	9,5446 b
	100%	7,5429 a	38,9351 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna dentro de cada dose de ANA, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

No meio MS 50%, à medida que as concentrações de ANA foram aumentados de 0,00 até 0,75 mgL^{-1}, foi estimado um aumento, em média, de 22 raízes por explante inoculado. A partir desse limite houve queda no enraizamento, nas concentrações avaliadas (Figura 1). Em meio MS 100% constatou-se que, à medida que o nível da auxina aumenta de a partir da concentração de 0,50mgL^{-1} , cresce em média, 21 raízes por plântulas *in vitro*

(Figura 2). Segundo PAIVA *et al* (1997) há exigência da presença de auxina no meio para que o enraizamento em plântulas de gloxínia seja induzido. JARVIS (1986) *apud* DIVO (2001) propôs um modelo utilizando auxinas endógenas e exógenas em quantidades diferentes, para o enraizamento diversificado das plântulas, no entanto, MUANGKAEWN & CHATO (1992) enraizaram brotos de gloxínia em ausência de fitorreguladores, mostrando a não exigência deles para o cultivo *in vitro*.

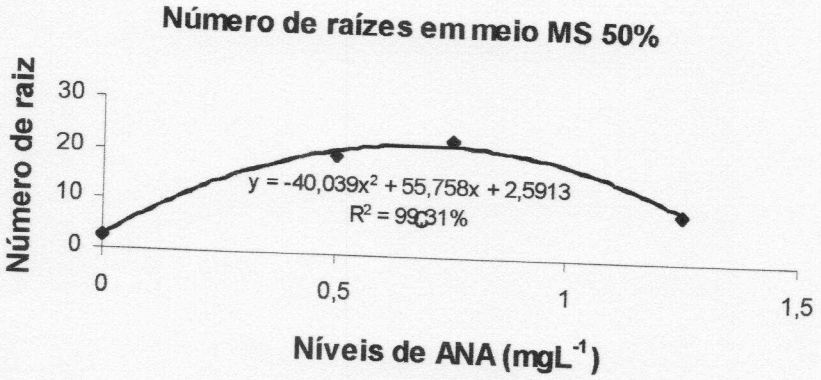


Figura 1: Número de raízes crescidas em meio MS 50% com diferentes concentrações de ANA . UFU. Uberlândia/MG. 2002.

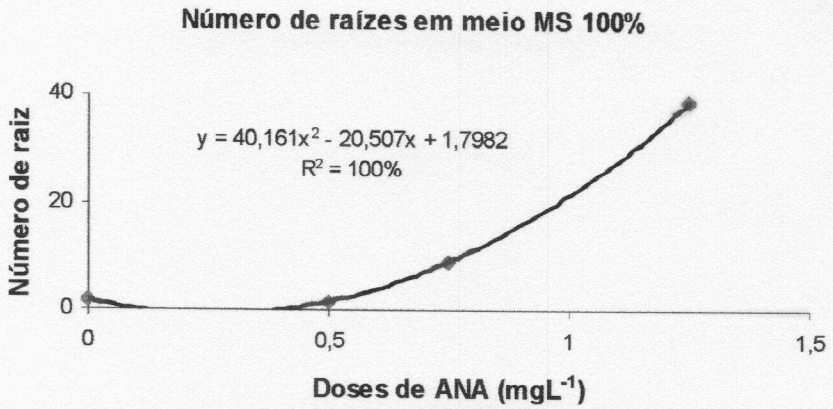


Figura 2: Número de raízes de gloxínia crescidas em meio MS 100% variando concentrações de ANA (mgL^{-1}). UFU. Uberlândia/MG. 2002.

O número de brotações de gloxínia foi influenciado tanto pela concentração de BAP isolado (Figura 3) quanto pela interação de ANA aos parcelamentos dos meios, como mostrado na Tabela 3. GEORGE (1996) afirma que a relação entre número e tamanho de brotos é inversamente proporcional, ou seja, números elevados de brotos são produzidos com alturas menores.

Para os níveis de BAP, observa-se que à medida que se aumenta a concentração da citocinina, de 0,40 até 0,80 mgL^{-1} , ocorre uma diminuição de, em média, 2 brotos por plântulas. A partir das concentrações de 0,80 mgL^{-1} até 1,60 mgL^{-1} do fitorregulador, há ligeiro acréscimo das brotações.

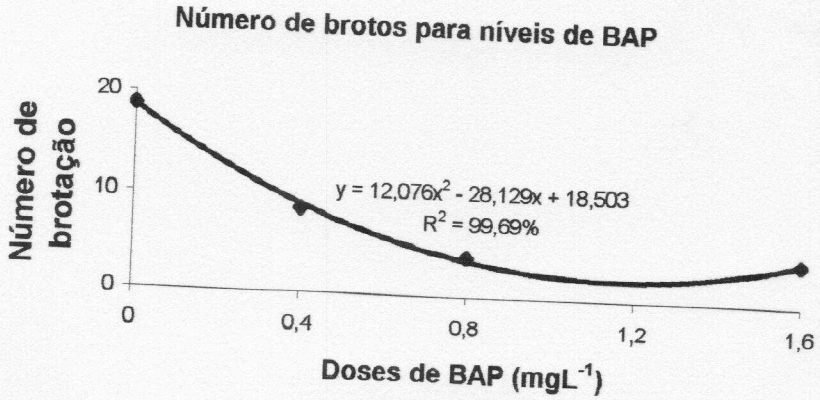


Figura 3: Número de brotos crescidos em diferentes concentrações de BAP (mgL^{-1}). UFU, Uberlândia/MG. 2002.

No meio MS 100% foi produzido um maior número de brotações por explante quando fitorreguladores de crescimento não foram adicionados (ANA 0,00 mgL^{-1}). Para as dosagens do fitorregulador, tanto no meio MS 50% como no meio MS 100%, o número de brotos formados foi estatisticamente igual (Tabela 3), fato observado, também, por MUANGKAWEN & CHATO (1992) que utilizaram o meio original para a indução de brotos de gloxínia, indicando a necessidade de todos os nutrientes em quantidades maiores para o desenvolvimento de brotos. Quando analisadas as dosagens de auxina no meio MS 50%, mostrado na Figura 4, verifica-se um acréscimo no número de brotações de 0,00 até o valor de 0,75 mgL^{-1} de ANA, com média estimada de 11 brotos produzidos por explante.

Com relação à altura dos brotos foi observada dependência dos três fatores em estudo, ou seja, houve a interação da auxina, da citocinina e do meio (ANA*BAP*MEIO). Em meio MS 50%, variando-se as doses de ANA em combinação com BAP, evidenciou-se que na ausência desse ocorreu um aumento na altura das brotações, em média, de 0,57cm nas

concentrações de ANA, de 0,00 até 0,75 mgL^{-1} já para a concentração 0,80 mgL^{-1} da citocinina, houve um decréscimo na altura dos brotos, em média, de 1,00 cm à medida em que a concentração de auxina variava de 0,00 até à concentração de 1,50 mgL^{-1} (Figura 5).

Analisando, ainda, o mesmo parcelamento do meio, de BAP e ANA, observou-se que, em ausência de ANA, a altura das brotações é maior, em média, 0,13 cm à medida que se aumenta a dosagem da citocinina, enquanto que adicionando-se 0,50 mgL^{-1} de auxina, ocorre decréscimo da altura, de 0,13 cm dos brotos, até à concentração de 1,60 mgL^{-1} de BAP (Figura 6). Esse resultado mostra que a altura dos brotos é dependente das concentrações de ANA e BAP.

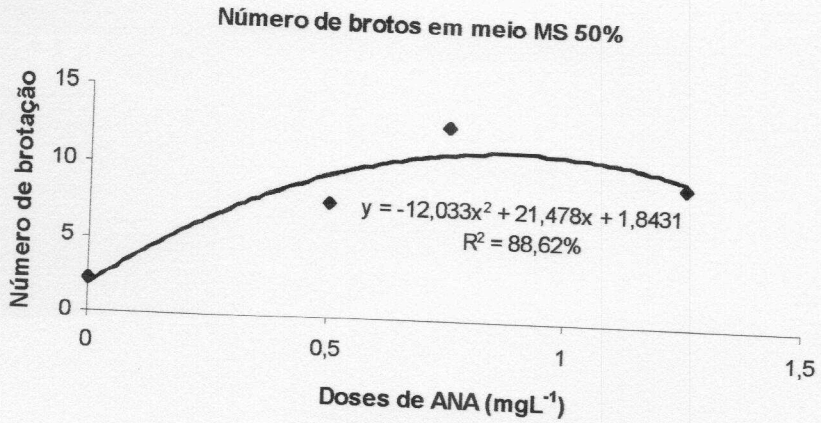


Figura 4: Número de brotações de gloxínia em meio MS 50% em concentrações diferenciadas de ANA. UFU. Uberlândia/MG. 2002.

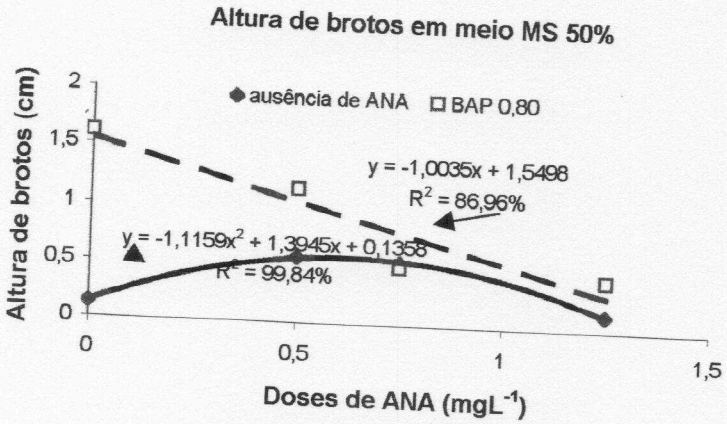


Figura 5: Altura de brotos em meio MS 50% variando as concentrações de BAP em combinação com ANA. UFU. Uberlândia/MG. 2002.

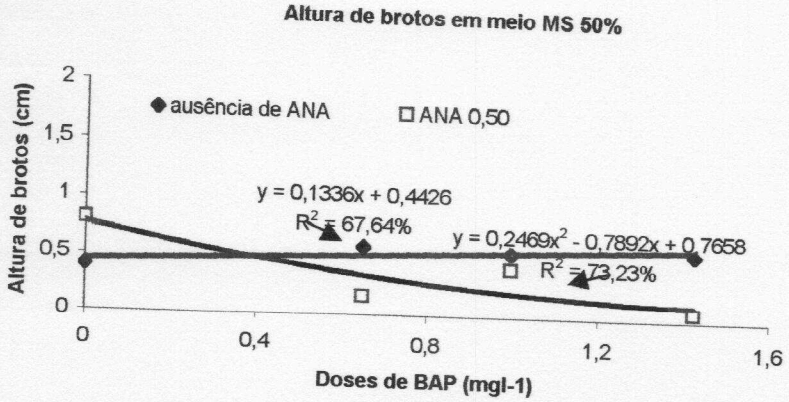


Figura 6: Altura das brotações de gloxínia em meio MS 50% variando-se as concentrações de ANA e BAP. UFU. Uberlândia/MG. 2002.

Em meio MS 100% verificou-se que, em ausência de ANA, à medida que se aumenta a dose de BAP há queda de, em média, 0,11 cm da altura dos brotos de gloxínia, *in vitro* (Figura 7).

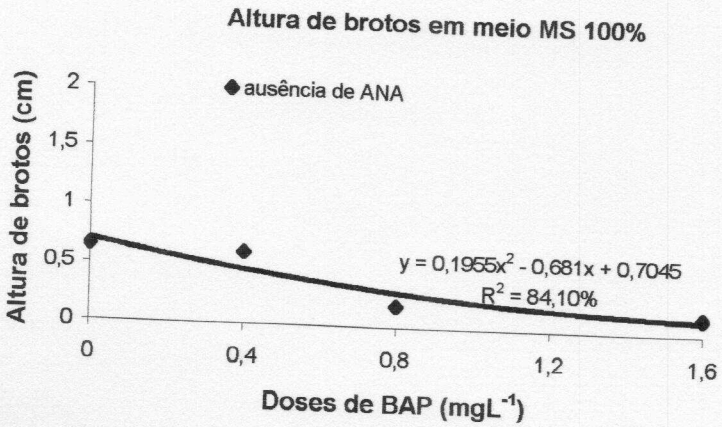


Figura 7: Altura de brotos de gloxínia em meio MS 100%, variando-se as doses de BAP e ANA. UFU. Uberlândia/MG. 2002.

A altura das brotações não variou para as combinações 0,00 - 0,40; 0,50 – 0,40; 0,50 – 1,60; 0,75 – 0,00; 0,75 – 0,80; 0,75 – 1,60 mgL^{-1} de ANA e BAP respectivamente, em ambos os meios e o mesmo ocorreu para todos os tratamentos envolvendo a dosagem 1,25 mgL^{-1} de auxina. No entanto, o meio de cultura MS 50% produziu maior altura envolvendo as seguintes combinações: 0,00 – 0,00 e 0,50 – 0,00 (ANA e BAP respectivamente). Já, para o meio 100%, verificou-se que as combinações 0,00 – 0,80; 0,00 – 1,60; 0,50 – 0,80 e 0,75 – 0,40 mgL^{-1} (ANA e BAP respectivamente) proporciona a melhor altura (Tabela 4).

Tabela 4: Altura de brotos, *in vitro*, em diferentes concentrações de meio de cultura variando quantidades de ANA e BAP. UFU. Uberlândia/MG. 2002.

ANA (mgL^{-1})	BAP (mgL^{-1})	MEIO MS	
		50%	100%
0.00	0.00	0.9962 a	0.1335 b
	0.40	0.5750 a	1.1807 a
	0.80	0.4382 b	1.6033 a
	1.60	0.1287 b	0.6762 a
0.50	0.00	1.4244 a	0.5656 b
	0.40	0.5975 a	0.4572 a
	0.80	0.0759 b	1.1583 a
	1.60	0.4394 a	0.3617 a
0.75	0.00	0.6645 a	0.5425 a
	0.40	0.6709 b	1.5259 a
	0.80	0.4758 a	0.4983 a
	1.60	0.4594 a	0.2219 a
1.25	0.00	0.6502 a	0.1377 a
	0.40	0.6083 a	0.4690 a
	0.80	0.1782 a	0.4307 a
	1.60	0.1335 a	0.2195 a

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tanto em meio MS 50% como no meio MS 100%, a ausência de ANA não induziu a formação de calos, entretanto, à medida que foi aumentada as doses da auxina, um maior número de calo foi produzido, independente da concentração de BAP (Tabelas 5 e 6), fato que, também, foi observado por PAIVA *et* al (1997).

A maior indução dos calos foi verificada em meio MS 100%, com ocorrência deles em todos os tratamentos que continham qualquer concentração do fitorregulador ANA.

Tabela 5: Número de calos totais, por tratamento, em explantes de gloxínia cultivados em meio MS 50% contendo ANA e BAP em diferentes concentrações (mgL^{-1}). UFU. Uberlândia/MG. 2002.

BAP mgL^{-1} / ANA mgL^{-1}	0,00	0,40	0,80	1,60
0,00	0	0	0	0
0,50	3	4	4	4
0,75	5	5	3	5
1,25	5	5	5	3

Tabela 6: Número de calos, totais por tratamento, em explantes de gloxínia cultivados em meio MS 100% contendo ANA e BAP em diferentes concentrações (mgL^{-1}). UFU. Uberlândia/MG. 2002.

BAP mgL^{-1} / ANA mgL^{-1}	0,00	0,40	0,80	1,60
0,00	0	0	0	0
0,50	5	5	5	5
0,75	5	5	5	5
1,25	5	5	5	5

A presença de BAP, tanto isoladamente quanto em interação com ANA e com os meios, não induziu a formação radicular. Esse mesmo fato foi relatado por PAIVA *et al* (1997), GEORGE (1996) e TORRES & CALDAS (1990) que observaram um efeito inibidor da citocinina no processo de formação de raízes.

4. CONCLUSÕES

- Os principais contaminantes encontrados na cultura de tecido da gloxínia foram o *Fusarium* e o *Aspergillus* .

- O enraizamento *in vitro* foi melhor quando metade dos nutrientes do meio MS foi utilizada.

- Tanto o número de brotações quanto a altura delas foi maior em meio MS 100%.

- A concentração de 0,75 mgL^{-1} de ANA induziu o melhor enraizamento *in vitro.*

- O maior número de brotações ocorreu em ausência da citocinina, enquanto que a concentração de 0,75 mgL^{-1} da auxina proporcionou um acréscimo no número de brotos produzidos.

- A altura dos brotos é influenciada pelas concentrações de ANA e BAP e pelo meio de cultura.

- A maior altura das brotações foi observada com a concentração de 0,62 mgL^{-1} de ANA em meio MS 50% isento de BAP.

- A presença de ANA em todas as concentrações utilizadas, independente da concentração de BAP provocou a formação de calos na cultura.

- Evidenciou-se uma maior formação de calos para o meio MS 100%.

- A presença de BAP nos meios de cultura não induziu a formação radicular.

- Em escala comercial, o melhor meio para o cultivo *in vitro* da gloxínia é o MS 50%, pois proporciona uma maior formação de raízes, garantindo consequentemente, uma melhor aclimatação.

- Tal concentração permite, ainda, a redução de custos para o cultivo.

RECOMENDAÇÕES AGRONÔMICAS

Para que novas pesquisas possam ser desenvolvidas, utilizando-se a gloxínia, recomenda-se:

- Produzir as próprias matrizes.

- Controlar a temperatura, luminosidade e patógenos no local onde as mesmas serão produzidas.

- Fazer uma intensa assepsia durante a instalação do experimento.

- Deve ser feita uma desinfestação rigorosa nos explantes utilizados no cultivo *in vitro*.

- Para as pessoas que desejam possuir gloxínias em suas residências, recomenda-se colocá-las em local onde seja possível controlar a temperatura e as horas de iluminação direta nas plantas, além de realizar podas nas folhas e flores danificadas impedindo a proliferação de patógenos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L.M.C.O. 1998. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica*).** Lavras- MG- UFLA. Dissertação de Mestrado, 86p.

ARRUDA, S.A. 1996. **Estudos em algumas espécies floríferas brasileiras.** Uberlândia - MG- UFU. Monografia do Curso de Graduação de Agronomia, 47p.

ARRUDA, S. A. 2000. **Produção de propágulos de batata doce [*Ipomea batatas* L. (Lam.)] obtidos *in vitro* e submetidos a tratamentos prévios com fungicida e bactericida.** Jaboticabal – SP – UNESP. Dissertação de Mestrado, 42p.

BRAGA, M. F.; CALDAS, L.S.; HABE, M.H. 1997. Estabelecimento da acerola (*Malpighia Glabra L*) *in vitro*: efeito do clone e do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura. 19(3)** : 35-346. Cruz das almas-BA.

CASTRO,T. MIRIAM, C. 1988. O mercado de flores brasileiro. **Revista Globo Rural.. 15(6)** : 26-28. São Paulo.

DEBERGH, P.C & ZIMMERMAN, R.H. 1991. **Micropropagation. Technology and Application**. 1 ed. London: Kluwer Academic Publishers. 48p.

DE- FOSSARD, R.A. 1985. **Establishment of laboratory regenerantes underfield conditions.** In: International Workshop on biotecnology in agriculture: Envolvim a research agenda for the ICGEB. New Delhi. p. 193-201.

DIVO, S.M. *et al.* 2001. http://www.verdeesvida.com.ar/premio.htm. **Interacción entre auxinas, citoquininas y/o fertilizantes durante el enraizamiento y rustificacción de estaquillas de *Jasminum mesnyi* (jazmím amarillo).**

GEORGE, E.F. 1996. Plant propagation by tissue culture. Part 1 – 2 ed. **The Technology**. Edington: Exergetics Limited. 1574p.

GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A. 1990. **Micropropagação.** In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH. p. 99-169.

HERMAN, B.E. 1996. **Agriceel report. A plant tissue culture Newsletter.** v.27, n.4.

HERNANDÉZ, H.J., RUBIO, L.J. 2002. http://www.uv.mx/iiesca/revista2/acerves2.html **Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad**.

JOHNSON, B.B. 1978. *In vitro* propagation of Gloxinia from leaf explants. **HortScience News. 13(2)** : 149-150.

MANTEL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; McKEE, R.A. 1994. Princípios de biotecnologia em plantas: Uma introdução à engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto, SBG. 333p.

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

MUANGKAEWN, A. CHATO, S. 1992. *In vitro* micropropagation of gloxinia. **Kaen Kaset Agriculturem Journal. 20(6)** : 339-342.

OLIVEIRA, P.D., PASQUAL, M., PAIVA, R. 1996. Efeito de diferentes concentrações de meio MS, nitrogênio e sacarose na micropropagação de crisântemo "Orange Reagen". **Bragantia. 55(1)** : 9-18.

ONIS, J.M. 1975. **Cultivo ornamentales**. 1.ed. Barcelona: Aedos, 317p.

PAIVA, P.D., *et al.* 1997. Propagação *in vitro* de Gloxínia. **Revista Brasileira Horticultura Ornamental. 3(2)** : 29-41. Campinas.

PARANHOS, T.J., PERRANDO, E., FRANCO, H.E.T., AITA, A. 1996. Regeneração *in vitro* das cultivares de tomate Empine e Monte Carlo. **Revista Horticultura Brasileira. 14(2)** : 203-207. Brasília.

RIBEIRO, A.O. 1999. **Definição de meio de cultura para morfogênese indireta em alface variedades Verônica e Maioba.** Uberlândia - MG- UFU. Monografia do Curso de graduação de Ciências Biológicas, 39p.

SILVA, G. 1995. Safra de cores. **Revista Globo Rural. 10(119) :** 49-53. São Paulo-SP.

THOMSON, W.T. 1993. Agricultural chemical. Book IV – Fungicides. n.23, p. 303-312.

TORRES, C.A.; CALDAS, S.C.; BUSO, J.A. 1998. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa. vol1. 509p.

TORRES, C.A., CALDAS, S.C. 1990. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília:ABCTP/EMBRAPA-CNPH. p.37-70.

VERÍSSIMO, S. 2001. Um negócio romântico. **Revista Exame. 35(23)** : 24. São Paulo.

VIRLANAU, E.G.; GUARRO, E. 1974. **Cultivo de las flores**. 1.ed. Buenos Aires: Albatros Lavalle. 436p.