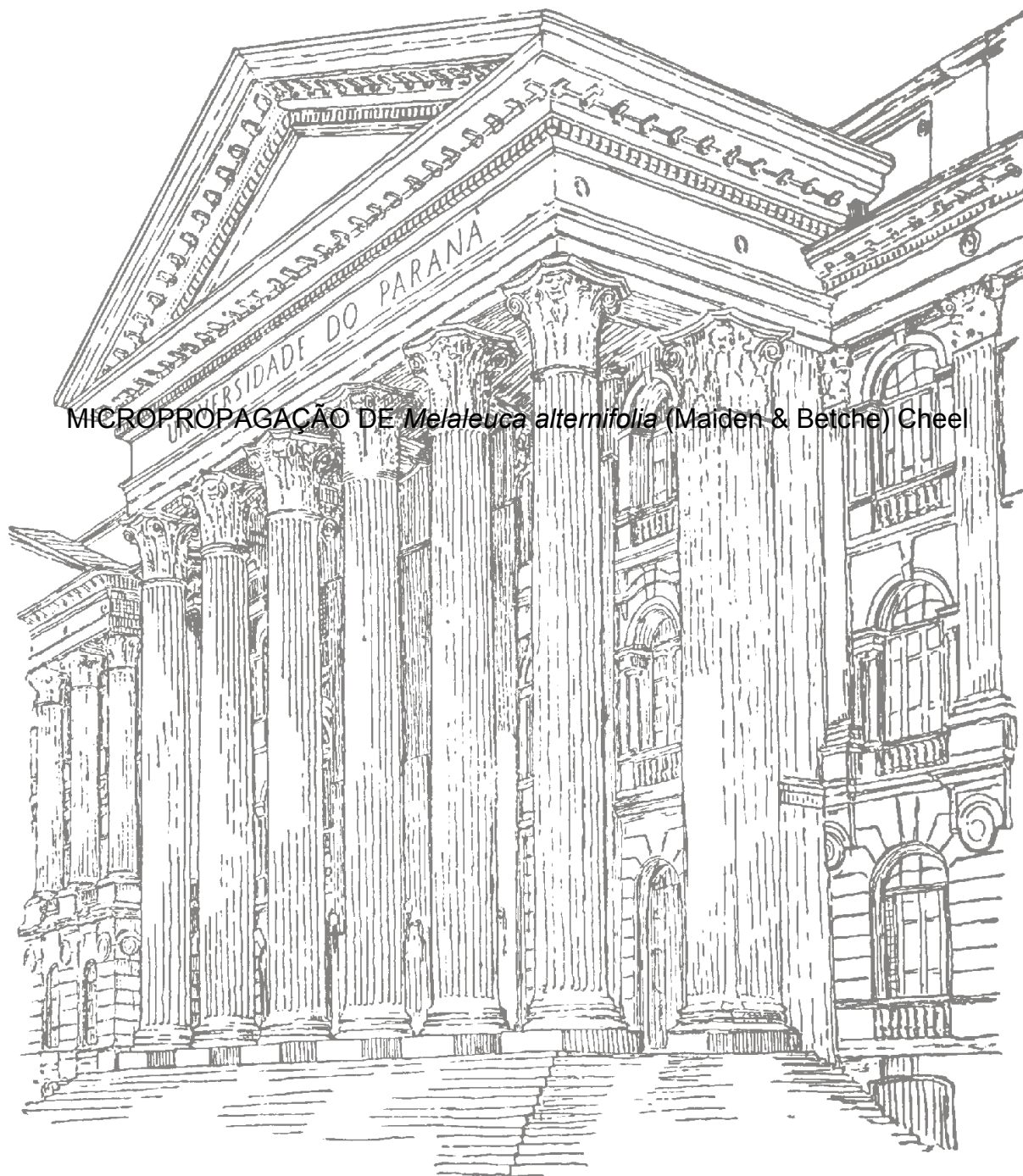


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

YOHANA DE OLIVEIRA



MICROPROPAGAÇÃO DE *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel

CURITIBA
2009

YOHANA DE OLIVEIRA

MICROPROPAGAÇÃO DE *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título do Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marguerite G. G. Quoirin

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi

CURITIBA
2009

A Deus, na pessoa do Senhor Jesus Cristo, meu Salvador, ofereço.
Aos meus pais, Uéder e Marinez, exemplos de caráter e honestidade, por toda força e amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela benção da vida e por permitir que as pessoas abaixo citadas façam parte dela.

Aos meus pais, Uéder Florindo de Oliveira e Marinez Florindo de Oliveira, por me conduzirem sempre com motivação, força, responsabilidade e amor incondicional.

À Universidade Federal do Paraná e ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia-Produção Vegetal, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Professora Marguerite Quoirin pela orientação, incentivo, confiança, paciência e ensinamentos.

Ao Professor Luiz Antonio Biasi, pela co-orientação, ensinamentos e amizade.

A Prof^a Francine Lorena Cuquel, pelos ensinamentos, apoio e amizade.

A Empresa Herbia (Joinville-SC) e ao Professor Cícero Deschamps, pelo fornecimento do material vegetal inicial.

A banca de pré-defesa, composta pela Prof^a Luciana Lopes F. Ribas, Prof^a Marguerite Quoirin e Prof. Luiz A. Biasi, pelas correções e críticas construtivas.

A banca de defesa, composta pela Prof^a Marguerite Quoirin, Prof. Luiz A. Biasi e Pesquisadora Regina C. Quisen, pelas dicas valiosas.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

À Dr^a Regina Caetano Quisen, grande amiga-irmã “fortona”, que despertou em mim a paixão pela pesquisa, e formou a base do conhecimento para que este trabalho fosse realizado.

Às minhas para sempre irmãs “fortonas”, Sandra, Justina, Giovana e Fernanda pela amizade, companheirismo e força.

Ao meu novo e grande amigo André, pelas dicas estatísticas, amizade e momentos de descontração. Aos estagiários: Emílio, Ivan e Pedro, pela dedicação e auxílio na manutenção dos experimentos. As amigas de Pós-Graduação Sibebe, Mariane, Paola e Melicia pelo carinho constante e momentos alegres.

Aos meus irmãos, Uéder Júnior e Mylana, por todo amor e a todos os meus familiares, pela torcida e energia positiva.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, todo o meu amor e gratidão.

Eu Sou a videira, e o Pai é o lavrador
(João 15:1)

“Jesus é a Videira verdadeira. Eu sou um ramo. Meu Pai é o agricultor. Ele é meu Zelador, meu Protetor, meu Escudo, meu Sustentador, meu Treinador, meu Educador. Darei muitos frutos!”

Keinneth E. Hagin

RESUMO

Melaleuca alternifolia vem sendo cultivada de forma crescente no Brasil e tem como produto principal o óleo essencial, cujo consumo ocorre principalmente pelas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de limpeza. Embora o cultivo de *Melaleuca* seja economicamente lucrativo, pouco se tem relatado sobre a propagação desta espécie. Diante disto, esse trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de micropropagação para a produção de clones de *M. alternifolia*, visando propagar genótipos superiores na produção de óleo essencial, em larga escala, além de servir como base para estudos relacionados ao melhoramento genético. Para tanto, o trabalho foi dividido em três etapas, sendo a primeira relacionada ao estudo de alguns fatores que interferem no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais, ou seja, a concentração (0,25; 0,50 e 1,0%) de NaOCl, o tempo de imersão (10 e 20 min) na solução germicida, e a utilização de fungicida tiofanato-metílico (2 g L⁻¹) na maior concentração e tempo. Além disto, foi estudada a influência da presença ou não de ágar (6 g L⁻¹) e do carvão ativado (2 g L⁻¹) nos meios de cultura MS e WPM, durante o cultivo inicial. A segunda etapa foi orientada para o estudo da influência do meio mineral (MS e WPM), da presença do ágar e de diferentes concentrações da citocinina BAP (0; 0,55; 1,11; 2,22; 3,33; e 4,44 µM) na proliferação de gemas adventícias. Já a terceira etapa foi voltada para o estudo da ação de diferentes tipos de auxinas (ANA, AIA, AIB) aplicadas em duas concentrações (0,53 e 2,64 µM), bem como a influência de diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30 e 45 g L⁻¹) e tipos de meio de cultura (MS, MS/2, MS com carvão ativado, MS/2 com carvão ativado) durante o enraizamento *in vitro* da espécie, além de ser realizado o estudo da sobrevivência das mudas enraizadas em cada meio de cultura, após a aclimatização. Pôde-se concluir que o tratamento com fungicida e 1,0% de NaOCl por 20 min favorece o estabelecimento de 80% dos explantes, não havendo diferença entre os dois meios de cultura testados (MS e WPM). Na etapa de estabelecimento *in vitro*, os explantes cultivados em meio semi-sólido, MS ou WPM, sem BAP, apresentam o maior número médio de brotações por explante (1,83). Os explantes respondem de forma diferente quanto à concentração de BAP no meio WPM e MS, líquido e semi-sólido, sendo que o meio de cultura MS líquido, com 1,11 µM de BAP, proporciona o maior número médio de brotações por explante (11,8). Para o enraizamento de *Melaleuca alternifolia*, é dispensável o suprimento de auxinas no meio de cultura, sendo a sacarose necessária, pois influencia de forma positiva a formação de raízes. Além disso, o meio de cultura MS permite 100% de enraizamento e de sobrevivência durante a aclimatização das mudas.

Palavras-chave: Óleo essencial. Planta medicinal. "Tea tree".

ABSTRACT

Melaleuca alternifolia has been cultivated in extensive areas in Brazil. Its main product is the essential oil useful in cosmetic and pharmaceutical industries. Though its economic importance, there is little knowledge about its *in vitro* propagation. The aim of this study was to establish a protocol of micropropagation of *M. alternifolia* for the clonal propagation of elite genotypes with superior oil yield. This study was divided in three stages: (1) *In vitro* establishment of nodal segments. Disinfection was carried out with 0.25; 0.50 and 1.0% of NaOCl and the time of exposition was 10 and 20 min. Different culture media were tested (MS and WPM) with or without agar (6 g L⁻¹) and activated charcoal (0.2%), beyond the use of fungicide Cercobin® (0.2%) in the highest concentration of NaOCl. (2) For *in vitro* multiplication, MS and WPM media were tested, solid and liquid, supplemented with BAP at 0, 0.55, 1.11, 2.22, 3.33 and 4.44 µM. (3) *In vitro* rooting was promoted by different auxins (NAA, IAA and IBA) all at 0.53 and 2.64 µM. Several sucrose concentrations were also tested: 0, 15, 30 and 45 g L⁻¹. Four culture media were used: MS, MS/2, MS+AC and MS/2+AC. Rooted plantlets from different culture media were acclimatized and the survival percentage was evaluated. In conclusion, the best result of disinfection was obtained with fungicide and 1.0% of NaOCl for 20 min, which promoted the establishment of 80% of the explants. During establishment *in vitro*, there was no statistical difference between the results with the use of MS and WPM BAP-free media; nevertheless the semi-solid media promoted higher shoot number per explant (1.83). The explants response to BAP concentrations was different in MS or WPM media, semi-solid or liquid. On liquid MS medium supplemented with 1.11 µM BAP, the highest mean shoot number was reached (11.8). Auxins are not necessary for *in vitro* rooting of *M. alternifolia*. Plantlets rooted in the absence of auxin presented the highest survival rate during acclimatization in the greenhouse.

Key words: Essential Oil. Medicinal plant. Tea tree.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - ASPECTO DAS FOLHAS DE *Melaleuca alternifolia* 16
- FIGURA 2- A. PLANTAS MATRIZES DOADORAS DOS EXPLANTES, EM CASA-DE- VEGETAÇÃO. B. SEGMENTOS NODAIS UTILIZADOS COMO EXPLANTE. C. SEGMENTOS NODAIS DE *M. alternifolia* APÓS 30 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*: SEM CONTAMINAÇÃO, COM CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E APRESENTANDO CONTAMINAÇÃO BACTERIANA, DA ESQUERDA PARA A DIREITA, RESPECTIVAMENTE. BARRA: 1 CM. 37
- FIGURA 3 - ASPECTO DAS BROTAÇÕES DE *M. alternifolia* MANTIDAS POR 30 DIAS EM MEIO DE CULTURA WPM:
A. SEMI-SÓLIDO COM 0,55 μM DE BAP.
B. LÍQUIDO COM 0,55 μM DE BAP. C. LÍQUIDO COM 1,11 μM DE BAP. D. LÍQUIDO COM 2,22 μM DE BAP.
E. ASPECTO DAS BROTAÇÕES DE *M. alternifolia* AOS 30 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA MS LÍQUIDO CONTENDO 0,55 μM DE BAP.
F. ASPECTO DE TUFO COM BROTAÇÕES ALONGADAS, AOS 30 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*, MANTIDO EM MEIO DE CULTURA MS LÍQUIDO COM 1,11 μM DE BAP. BARRA: 1 CM. 52
- FIGURA 4 - FIGURA 4 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NA PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO DE *M. alternifolia* (A); NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES (B); COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES (C); ALTURA DA PARTE AÉREA (D) E MASSA FRESCA TOTAL (E)..... 66
- FIGURA 5 - A. ASPECTO DAS PLANTAS ENRAIZADAS DE *M. alternifolia* EM DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES DE AUXINAS NO MEIO DE CULTURA MS. B. ASPECTO DAS PLANTAS ENRAIZADAS DE *M. alternifolia* EM MEIO DE CULTURA MS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE. C. ASPECTO DAS PLANTAS ENRAIZADAS DE *M. alternifolia* EM DIFERENTES VARIAÇÕES DO MEIO MS. D. ASPECTO DAS MUDAS DE *M. alternifolia* APÓS 30 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO. BARRA: 1 CM..... 74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO NA DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>Melaleuca alternifolia</i> , AOS 30 DIAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	31
TABELA 2 - EFEITO DO ÁGAR E DO CARVÃO ATIVADO NOS MEIOS MS E WPM NO NÚMERO E BROTAÇÕES EM SEGMENTOS NODAIS DE <i>M. ALTERNIFOLIA</i> , AOS 20 DIAS DE CULTIVO	34
TABELA 3 - NÚMERO MÉDIO DE BROTOS POR EXPLANTE E PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO NA MULTIPLICAÇÃO DE <i>M. alternifolia</i> , AOS 30 E 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM (médias entre os dois subcultivos)....	45
TABELA 4 - MASSA FRESCA E MASSA SECA DE <i>M. alternifolia</i> , AOS 30 E 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM (médias entre os dois subcultivos)	47
TABELA 5 - NÚMERO MÉDIO DE BROTOS E PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO NA MULTIPLICAÇÃO DE <i>M. alternifolia</i> , AOS 30 E 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA MS (médias entre os dois subcultivos)	48
TABELA 6 - MASSA FRESCA E MASSA SECA DE <i>M. alternifolia</i> , AOS 30 E 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA MS (médias entre os dois subcultivos)	51
TABELA 7 - PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO E MASSA FRESCA DE MICROESTACAS ENRAIZADAS EM MEIO DE CULTURA MS CONTENDO DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES DE AUXINA	62
TABELA 8 - NÚMERO E COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES E ALTURA DA PARTE AÉREA DE MICROESTACAS ENRAIZADAS EM MEIO MS CONTENDO DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES DE AUXINA	63
TABELA 9 - EFEITO DE DIFERENTES VARIAÇÕES DO MEIO MS NO ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>M. alternifolia</i>	69
TABELA 10 - SOBREVIVÊNCIA DAS PLANTAS DE <i>M. alternifolia</i> , ENRAIZADAS EM MEIOS DE CULTURA CONTENDO DIFERENTES TIPOS DE CONCENTRAÇÕES DE AUXINA, AOS 30 E 60 DIAS DA ACLIMATIZAÇÃO.....	71

TABELA 11 - SOBREVIVÊNCIA DAS PLANTAS DE <i>M. alternifolia</i> , ENRAIZADAS EM MEIO DE CULTURA MS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, AOS 30 E 60 DIAS DA ACLIMATIZAÇÃO.....	71
TABELA 12 – SOBREVIVÊNCIA DAS PLANTAS DE <i>M. alternifolia</i> , ENRAIZADAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, AOS 30 E 60 DIAS DA ACLIMATIZAÇÃO.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido α -naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
CA	Carvão ativado
CIN	Cinetina
CV	Coefficiente de variação
MS	Meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962)
MS/2	Meio MS com a concentração dos sais reduzida à metade
PA	Parte aérea
WPM	Meio de cultura Woody Plant Medium de LLOYD e Mc COWN (1980)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 O GÊNERO <i>Melaleuca</i>	15
2.2 <i>Melaleuca alternifolia</i>	16
2.3 ÓLEO ESSENCIAL	17
2.4 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA	18
2.5 MICROPROPAGAÇÃO	20
REFERÊNCIAS	22
3 ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Melaleuca alternifolia</i>	25
3.1 INTRODUÇÃO	27
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.2.1 Material vegetal	28
3.2.2 Condições de cultura <i>in vitro</i>	29
3.2.3 Concentração e tempo de imersão em hipoclorito de sódio na asepsia de segmentos nodais de <i>M. alternifolia</i>	29
3.2.4 Influência de diferentes meios de cultura no estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>M. alternifolia</i>	30
3.2.5 Análise estatística	30
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.3.1 Concentração e tempo de imersão em hipoclorito de sódio na asepsia de segmentos nodais de <i>M. alternifolia</i>	31
3.3.2 Influência de diferentes meios de cultura no estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>M. alternifolia</i>	34
3.4 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	38
4 MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Melaleuca alternifolia</i>	40
4.1 INTRODUÇÃO	42
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.2.1 Material vegetal	43
4.2.2 Condições de cultura <i>in vitro</i>	43
4.2.3 Efeito da utilização do ágar e concentrações de BAP em diferentes meios de cultura	44
4.2.4 Delineamento experimental e análise estatística	44
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.3.1 Experimento 1: Meio de cultura WPM	45
4.3.2 Experimento 2: Meio de cultura MS	47
4.4 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	53
5 ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO DE <i>Melaleuca alternifolia</i>	55
5.1 INTRODUÇÃO	57
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	58
5.2.1 Material vegetal	58
5.2.2 Condições de cultura	58
5.2.2.1 <i>In vitro</i>	58
5.2.2.2 <i>Ex vitro</i>	59
5.2.3 Variáveis analisadas.....	59

5.2.4 Efeito do ANA, AIA e AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>M. alternifolia</i>	59
5.2.5 Delineamento experimental e análise estatística	60
5.2.6 Efeito de diferentes concentrações de sacarose no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>M. alternifolia</i>	60
5.2.7 Delineamento experimental e análise estatística	60
5.2.8 Efeito de diferentes meios de cultura no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>M. alternifolia</i>	61
5.2.9 Delineamento experimental e análise estatística	61
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.3.1 Efeito do ANA, AIA e AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>M. alternifolia</i>	61
5.3.2 Efeito de diferentes concentrações de sacarose no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>M. alternifolia</i>	65
5.3.3 Efeito de diferentes meios de cultura no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>M. alternifolia</i>	69
5.3.4 Efeito dos meios de cultura utilizados no enraizamento sobre a sobrevivência das plantas	71
5.4 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	75
6 CONCLUSÕES GERAIS	79
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os principais gêneros pertencentes à família Myrtaceae são: *Eucalyptus*; *Melaleuca*; *Eugenia* (exemplo: oliveira) e *Psidium* (exemplo: goiabeira). São cultivados no Brasil para várias finalidades, principalmente por apresentarem frutos comestíveis, serem fonte de madeira e lenha, conterem óleos essenciais e, pela aparência de algumas espécies, são utilizados como ornamentais (SIANI et al., 2000).

A *Melaleuca alternifolia* Cheel é conhecida na Austrália como “tea tree” (árvore de chá), sendo nativa da região de New South Wales onde cresce em regiões pantanosas ou próximas a rios (RIEDL, 1997). Tem como produto principal o óleo essencial, sendo os principais consumidores a América do Norte e Europa, principalmente indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de limpeza, devido as suas propriedades farmacológicas. No Brasil o seu cultivo é crescente, sendo a espécie conhecida somente por *Melaleuca*.

Um dos inconvenientes na produção de óleos essenciais é a variabilidade na sua composição quando é oriundo de plantas produzidas pela via sexuada, pois a produção de metabólitos secundários está diretamente relacionada com o genótipo da planta. Logo, um método de clonagem de plantas que apresentem características superiores em termos de produção e composição do óleo essencial, mostra-se como uma ferramenta interessante na otimização deste processo.

Trabalhos de domesticação de plantas medicinais são escassos ou inexistentes para a maioria das espécies, sendo necessário o desenvolvimento de estudos relacionados à adaptação destas plantas às condições de cultivo, principalmente em virtude do aumento da demanda por parte das indústrias farmacêutica e cosmética (COSTA et al., 2007a). Embora o cultivo de *Melaleuca* seja economicamente lucrativo, pouco se tem relatado sobre a propagação desta espécie.

A propagação vegetativa é uma importante ferramenta no melhoramento de espécies lenhosas e herbáceas e vem sendo amplamente utilizada, visando melhorar e manter variedades de importância econômica e medicinal (EHLERT et al., 2004). A micropropagação pode ser uma ferramenta vantajosa na obtenção destes clones em larga escala, permitindo rapidez, uniformidade e bom estado

fitossanitário, além de servir como suporte para programas de melhoramento genético.

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo estabelecer um protocolo de micropropagação para *M. alternifolia*, visando a propagação de genótipos superiores em larga escala.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O GÊNERO *Melaleuca*

A família Myrtaceae divide-se em duas subfamílias: Myrtoidea, de ampla ocorrência na América tropical, e Leptospermoideae, que ocorre principalmente na Austrália, Malásia e Polinésia. O gênero *Melaleuca*, pertence a esta última, incluindo aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico (CRONQUIST, 1981).

Este gênero possui introdução recente no país, mostrando-se tolerante a variações climáticas e de solo, podendo ser cultivado em todo o território brasileiro (LORENZI, 2003). Poucas informações são encontradas com relação à taxonomia de *Melaleuca alternifolia*. Entretanto, as espécies *Melaleuca armillaris*, *Melaleuca leucadendron* e *Melaleuca linariifolia* já foram descritas por Lorenzi et al. (2003).

De uma forma geral, as árvores deste gênero são perenifólias, podendo apresentar de 5 a 15 m de altura, e possuem características ornamentais, tanto pelo aspecto da copa quanto do tronco. Suas folhas são simples, opostas, variando de 1,5 a 5,0 cm de comprimento, dependendo da espécie.

As inflorescências são axilares, em espigas cilíndricas, com grande número de estames e com coloração variando de branca a amarelada. Seus frutos são agrupados em cápsulas globosas, com numerosas sementes diminutas (LORENZI et al., 2003). Em *Melaleuca quinquenervia*, após a floração, de 30 a 70 cápsulas são produzidas por ramo, contendo cada cápsula, em média, 264 sementes (ALEXANDER e HOFSTETTER, 1975; MESKIMEN, 1962). O comprimento médio e o diâmetro das sementes são de 1,20 mm e 0,26 mm, respectivamente (RAYACHHETRY et al., 1998), havendo em média, em cada grama, 30.000 sementes de vários tamanhos, forma e peso (MESKIMEN, 1962; WOODALL, 1982).

M. armillaris mostra-se aparentemente tolerante a geadas, podendo ser cultivada no sul, além de apresentar um ótimo desenvolvimento e rápido crescimento no Sudeste (LORENZI et al., 2003). *M. leucadendron* é também utilizada para constituição de quebra-ventos, sendo feito menção à existência de óleo essencial em suas folhas. Entretanto, em relação às propriedades farmacológicas do óleo essencial, os trabalhos se restringem ao extraído de *M. alternifolia*, espécie alvo deste trabalho.

2.2 *Melaleuca alternifolia*

A espécie *M. alternifolia* Cheel (FIGURA 1) apresenta-se como uma árvore pequena de até 5 m, conhecida internacionalmente como “tea tree”. Possui casca fina, semelhante a folha de papel, folhas afiladas de aproximadamente 2,0 cm de comprimento e floresce no verão. É nativa da costa subtropical nordeste da Austrália, região de New South Wales, crescendo em regiões pantanosas ou próximas a rios (SILVA et al., 2002).

Esta espécie possui grande potencial ornamental, pelas características descritas acima. Entretanto, seu cultivo vem sendo recentemente realizado no Brasil pela grande demanda por seu óleo essencial, e existem poucos estudos relacionados à sua propagação.



FIGURA 1 - ASPECTO DAS FOLHAS DE *Melaleuca alternifolia*.

2.3 ÓLEO ESSENCIAL

No Brasil, o cultivo de *M. alternifolia* voltado para a extração do óleo essencial é recente. Entretanto, esta atividade apresenta grande potencial, tendo em vista a grande aplicabilidade, já descrita, que o seu óleo essencial possui.

O óleo essencial das plantas de *M. alternifolia*, cultivadas na Austrália, caracteriza-se pela mistura aproximada de 97 compostos, a maioria já identificados. Os principais constituintes são os compostos terpinen-4-ol, 1,8-cineol, α -terpineno, γ -terpineno, α -pineno, β -pineno, α -terpineol, *p*-cimeno e álcoois sesquiterpênicos, que representam cerca de 90% do óleo (BROPHY et al., 1989; MURTAGH e SMITH, 1996). Em *M. alternifolia* o rendimento da extração é de aproximadamente 1 a 2% da massa fresca da planta utilizada (CARSON e RILEY, 1993).

O Comitê Australiano de Padronização estabeleceu que o óleo deve conter quantidades de cineol abaixo de 15% e de terpinen-4-ol acima de 30% para que tenha eficácia mínima como anti-séptico (SIMÕES et al., 2002). Estudos sobre o teor, a composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. alternifolia* cultivada no Brasil, indicam que o óleo possui as mesmas características qualitativas e quantitativas do óleo australiano (SILVA, 2001).

Este óleo essencial possui comprovada ação antimicrobiana contra bactérias e bolores alteradores e/ou patogênicos, alguns vírus, microrganismos resistentes a antibióticos além de forte atividade repelente contra mosquitos, pulgas, piolhos entre outros. Devido às suas propriedades farmacológicas é utilizado em formulações farmacêuticas de vários produtos como shampoos, sabonetes, cremes dentais, anti-séptico bucal, repelente de insetos, produtos veterinários, germicidas de condicionadores de ar, dentre outros (SILVA et al., 2002). Estudos *in vitro* evidenciaram o seu potencial antifúngico e antibacteriano contra vários microorganismos. Testes com *C. albicans*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypsum* revelaram uma atividade antimicrobiana significativa contra esses microorganismos, sugerindo que o óleo pode ser útil no tratamento de infecções fúngicas da pele (CONCHA et al., 1998).

A Austrália é o principal fornecedor mundial do óleo essencial de *Melaleuca* (aproximadamente 400 t/ano). A China também produz o óleo, porém em escala não-significativa frente ao mercado mundial. No Brasil, as indústrias farmacêuticas e

casas de produtos naturais agregam valores ao óleo essencial de *Melaleuca* e até 2002 todo o óleo consumido era importado. O preço desse óleo encontra-se, hoje, num patamar econômico mundial elevado, resultado do monopólio produtivo australiano (CASTRO et al., 2005). Descoberto em 1920 por Penfold e Grant, o óleo é obtido por hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor das folhas de *M. alternifolia*, que hoje é cultivada na Austrália em escala industrial para atender às demandas crescentes do mercado (RIEDL, 1997).

M. leucadendron apresenta também menção quanto ao óleo essencial encontrado em suas folhas, também chamado de óleo-de-cajeput, obtido por destilação (LORENZI et al., 2003), embora *M. alternifolia* seja o foco dos estudos nesta área.

2.4 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

Quanto à propagação deste gênero, poucos relatos existem na literatura. Lorenzi et al. (2003) indicam que a propagação das espécies *M. armillaris*, *M. leucadendron* e *M. linariifolia* é exclusivamente feita pela via sexuada, ou seja, por sementes.

Hartman (1999) demonstrou com os seus experimentos que o processo de germinação da *Melaleuca* representa seu ponto fraco e possui grande potencial para estudo. Embora apresente baixos índices de germinação, o fato de cada árvore produzir milhões de sementes possibilita o seu estabelecimento. Nesse mesmo sentido, Woodall (1978) diz que as sementes de *Melaleuca quinquenervia* apresentam baixa adaptação para sobrevivência, mas devido ao grande número de sementes que são produzidas, as chances das plantas se estabelecerem são altas.

Um estudo realizado no sul da Flórida mostrou que 15% das sementes de *M. quinquenervia* que foram encontradas continham embriões (RAYACHHETRY et al., 1998) e, dessas sementes, 62% eram viáveis, e das sementes viáveis, 73% germinaram em casa-de-vegetação após 10 dias. Rayachhetry et al. (1998) indicaram que 27% das sementes restantes que não germinaram após este período poderiam apresentar dormência.

Além desses estudos, Bodle e Van (1999) afirmam que a viabilidade de germinação das sementes reduziu cerca de 50% após oito meses de permanência

no solo. Já Meskimen (1962) menciona que as sementes de *M. quinquenervia* podem sobreviver submersas na água por 6 meses e até serem viáveis e germinarem, entretanto, após um ano as sementes submersas perdem a sua viabilidade.

Entretanto, o rendimento da extração do óleo de um campo formado por árvores reproduzidas por sementes pode ser reduzido, pois este tipo de propagação pode gerar variabilidade considerável entre as plantas. Diante deste cenário, técnicas de clonagem são ferramentas importantes e decisivas para o sucesso da exploração da cultura em escala comercial. Além disto, a propagação vegetativa é uma importante ferramenta no melhoramento de espécies lenhosas e herbáceas e vem sendo amplamente utilizada, visando a melhorar e manter variedades de importância econômica e medicinal (EHLERT et al., 2004).

Embora Castro et al. (2005) tenham comprovado a rentabilidade do cultivo de *Melaleuca*, por meio de levantamento dos custos e receitas do cultivo da planta e extração do óleo essencial, informações sobre a propagação vegetativa desta espécie ainda são escassos. Estes estudos são de grande importância para o estabelecimento de campos de produção e exploração da cultura em larga escala.

Em Joinville - Santa Catarina, *M. alternifolia* é cultivada para extração de óleo essencial, sendo que as plantas matrizes foram estabelecidas a campo a partir de sementes australianas. Com isto, percebe-se uma grande variabilidade na composição do óleo e conseqüentemente, no rendimento da extração. Isso confirma a observação feita por List et al. (1996), quando comenta que as plantações de *M. alternifolia* são normalmente estabelecidas por meio de sementes coletadas de plantas que possuem alto rendimento, entretanto, há uma variabilidade significativa no rendimento e na qualidade do óleo essencial extraído dessas populações de plantas.

No entanto, a propagação clonal de um genótipo selecionado da *M. alternifolia*, oferece potencial para a obtenção de um grande número de indivíduos que produzam óleo essencial de excelente qualidade (LIST et al., 1996).

Em relação à propagação vegetativa de *M. alternifolia*, Costa et al. (2007b) testaram diferentes concentrações de AIB (0, 500, 1000 e 1500 mg L⁻¹) para o enraizamento das estacas (6 cm de comprimento). O melhor resultado quanto a porcentagem de estacas enraizadas (82,5%) foi encontrado com a aplicação de 1500 mg L⁻¹ de AIB em solução na base das estacas e 17,5% das estacas restante

não enraizaram mas sobreviveram. Já Oliveira et al. (2008) trataram estacas de melaleuca de diferentes tamanhos com a mesma concentração de AIB (1500 mg L^{-1}) e encontraram maior taxa de enraizamento (41,25%) em estacas com 10 cm de comprimento, sendo que este tipo de estaca apresentou 45% de sobrevivência. Estes resultados contrastantes nos levam a crer que esta espécie se comporta de forma distinta quanto ao enraizamento em virtude das características da estaca, da época do ano e do genótipo.

Diante deste cenário e visando a produção massal de clones superiores de *M. alternifolia*, faz-se necessário uma metodologia eficiente de propagação vegetativa, como a micropropagação, que alie alto índice de enraizamento e sobrevivência, independentemente da época do ano.

2.5 MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação ou propagação *in vitro* possui esta denominação devido ao tamanho dos propágulos utilizados (TORRES et al., 1998), englobando vários protocolos de regeneração a partir de tecidos vegetais, incluindo como explantes: folhas, gemas apicais ou axilares, segmentos nodais, dentre outros. Como forma de propagação vegetativa, baseada em técnicas de cultura de tecidos *in vitro*, a micropropagação torna-se uma alternativa para a regeneração de plantas que apresentam dificuldades de reprodução natural, e também onde os métodos convencionais de propagação vegetativa não se tornam viáveis (THORPE et al., 1991).

A técnica de micropropagação teve um forte impacto sobre a produção de plantas em larga escala e centenas de protocolos foram estabelecidos visando à produção comercial de mudas, como também à preservação de espécies vegetais ameaçadas de extinção (SOUZA e PEREIRA, 2007). Isto ocorreu devido ao fato desta técnica estar embutida nos programas de melhoramento que, na maioria das vezes, objetivam a manutenção ou a maximização do valor genético do clone a ser propagado, permitindo acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa (XAVIER e COMÉRIO, 1997; JOSHI et al., 2003).

De acordo com o tipo de explante inicial e sua subsequente manipulação, a micropropagação pode ser conduzida de três maneiras: multiplicação por meio de

proliferação de gemas axilares, por indução de gemas adventícias (via organogênese direta ou indireta) ou via embriogênese somática (TORRES et al., 1998).

A possibilidade de propagação massal de clones em um curto espaço de tempo, maior controle nutricional, ambiental e fitopatológico, transporte do material clonal por grandes distâncias sem danos, armazenamento por longos períodos e a retenção do vigor híbrido (GEORGE, 1993; BISHT et al., 1999) apresentam-se como as principais vantagens da micropropagação, que é uma técnica muito difundida.

Para *M. alternifolia*, existem poucos trabalhos relacionados a esta técnica. List et al. (1996) afirma que a propagação clonal de *M. alternifolia* por meio da cultura de tecidos oferece grande potencial para o estabelecimento de campos de produção a partir de indivíduos “elite” com alta produção de óleo essencial. A proliferação de gemas a partir de segmentos nodais de *M. alternifolia* cultivados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com a adição de 4,5 µM de BAP (6-benzilaminopurina) e 20 g L⁻¹ de sacarose, subcultivado por 12 semanas, foi recomendada por List et al. (1996) para a multiplicação das brotações.

Entretanto, cada espécie vegetal, ou mesmo diferentes variedades e genótipos dentro de uma espécie, possuem diferentes exigências nutricionais e hormonais para a sua multiplicação *in vitro*, sendo vários os fatores que podem influenciar a otimização de protocolos pré-estabelecidos.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, T. R.; HOFSTETTER, R. H. **Some current ecological aspects of *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) Blake in southern Florida**. in Florida Academy of Science 41st Annual Meeting, Lakeland, Florida. 1975.
- BISHT, P.; SHARMA, V. K.; JOSHI, I.; KAPOOR, M. L. Micropropagation of newly produced F1 hybrid of *Eucalyptus* (*E. tereticornis* Sm. x *E. camaldulensis* Dehn. Southern Form). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 48, n. 2, p. 104-108, 1999.
- BODLE, J. M.; VAN, T.K. Biology of *Melaleuca*. In: F. Laroche (ed.). **Melaleuca management plan, ten years of successful melaleuca management in Florida 1988-1998**. Florida Exotic Pest Plant Council. 1999. p. 7-12
- BROPHY, J. J.; DAVIES, N. W.; SOUTHWELL, I. A.; STIFF, I. A.; WILLIAMS, L. R. Gas chromatography quality control for oil of melaleuca terpin-4-ol-type (Australian tea tree). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Kensington, v. 37, p. 1330-1335, 1989.
- CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Letters in Applied Microbiology**, Nedlands, v. 16, p. 49-55, 1993.
- CASTRO, C.; SILVA, M. L.; PINHEIRO, A. L.; JACOVINE, L. A. G. Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 241-249, 2005.
- CONCHA, J. M.; MOORE, L. S.; HOLLOWAY, W. J. Antifungal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea-tree) oil against various pathogenic organisms. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, Bethesda, v. 88, n. 10, p. 489-92, 1998.
- COSTA, L. C. B.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Comprimento da estaca e tipo de substrato na propagação vegetativa de atoveran. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1157-1160, 2007a.
- COSTA, A. G.; STORCK, R. C.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; MOGOR, A. F. Diferentes concentrações de ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de melaleuca. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, 2007b (Suplemento).
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1260p.
- EHLERT, P. A. D.; LUZ, J. M. Q.; INNECCO, R. Propagação vegetativa da alfavaca-cravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 10-13, 2004.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2nd ed. Edington: Exegetics, 1993. v. 1, 574 p.

- HARTMAN, J. M. **Factors influencing establishment success of *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake** in Everglades National Park, p. 217-226, 1999.
- JOSHI, I.; BISHT, P.; SHARMA, V. K.; UNİYAL, D. P. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 52, n. 3/4, p. 110-113, 2003.
- LIST, S. E.; BROWN, P. H.; LOW, C. S.; WALSH, K. B. A micropropagation protocol for *Melaleuca alternifolia* (tea tree). **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, n. 36, p. 755-760, 1996.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2003. 173p.
- MESKIMEN, G. F. **A silvical study of the melaleuca tree in south Florida**. 177 p. (Tese). University of Florida, Gainesville, 1962.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.
- MURTAGH, G. J.; SMITH, G. R. Month of harvest and yield components of tea tree. II. Oil concentration, composition, and yield. **Australian Journal of Agricultural & Resource Economics**, Wollongbar, v. 47, p. 817-827, 1996.
- OLIVEIRA, Y.; SILVA, A. L. L.; PINTO, F.; QUOIRIN, M.; BIASI, L. A. Comprimento das estacas no enraizamento de melaleuca. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 3, p. 415-418, 2008.
- RAYACHHETRY, M. B.; T. K. VAN; CENTER, T. D. Regeneration potential of the canopy-held seeds of *Melaleuca quinquenervia* in south Florida. **International Journal of Plant Science**, Chicago, v. 159, n. 4, p. 648-654. 1998.
- RIEDL, R. W. **Practical methods for using tea tree oil**. Agro-Food Industry/Hi Tech. Ballina, set/oct, p.34-36, 1997.
- SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUZA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos Essenciais: Potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 16, p. 38-43, 2000.
- SILVA, S. R. S. **Composição química, avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e deficiência hídrica de *Melaleuca alternifolia* Cheel crescida no Brasil**. 2001. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
- SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. de A.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A.; PINHEIRO, A. L. Efeitos do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1363-1368, 2002.

SIMÕES, R. P.; GROppo, F. C.; SARTORATO, A.; DEL FIO, F. S. A.; FILHO, T. R. M.; RAMACCIATO, J. C.; RODRIGUES M. V. N. Efeitos do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre a infecção estafilocócica. **Lecta**, Bragança Paulista, v. 20, n. 2, p 147-152, 2002.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation**: technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311-336.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 3. ed. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa-CNPH. 1998.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Enraizamento "ex vitro" de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas e alongadas "in vitro". **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 51, p. 29-36, 1997.

WOODALL, S. L. Seed dispersal in *Melaleuca quinquenervia*. **Florida Scientist**, Orlando, v. 45, n. 2, p. 81-93, 1982.

WOODALL, S. L. **Melaleuca in Florida**: A Progress Report on Research by the United States Forest Service, Forest Resources Laboratory. Lehigh Acres, FL. 1978. 27p.

3 ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Melaleuca alternifolia*

RESUMO

As espécies lenhosas apresentam dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, principalmente quando é utilizado material vegetal proveniente de plantas adultas. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de agentes germicidas e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de explantes de *M. alternifolia*. Foram testadas concentrações de hipoclorito de sódio (0,25; 0,50; 1,0%) e tempos de imersão (10 e 20 min) e um tratamento com tiofanato-metílico (2 g L⁻¹) antes da imersão em hipoclorito de sódio 1% por 20 min. Também foram testados os meios de cultura MS e WPM nas formas semi-sólida (6 g L⁻¹ de ágar), líquida e semi-sólida com carvão ativado (2 g L⁻¹). Para ambos os ensaios, foram utilizados segmentos nodais retirados de plantas matrizes, mantidas em casa-de-vegetação, com aproximadamente 1 cm de comprimento. No ensaio de assepsia, o melhor tratamento foi o com fungicida e 1,0% de NaOCl, que favoreceu a eliminação total de bactérias e a diminuição significativa da proliferação de fungos, permitindo o estabelecimento de 80% dos explantes. Não houve diferença significativa entre os dois meios de cultura testados (MS e WPM) com relação à quantidade de brotos formados por explante. Independentemente do meio de cultura utilizado (MS ou WPM), observou-se o maior número médio de brotações por explante (1,83) no meio semi-sólido sem carvão ativado, seguido do meio semi-sólido com carvão ativado (1,45) e do meio líquido (1,01).

Palavras-chave: Cultura de tecidos. Micropropagação. Planta aromática. Planta medicinal.

IN VITRO ESTABLISHMENT OF *Melaleuca alternifolia*

ABSTRACT

Woody species are difficult to establish *in vitro*, especially when explants from adult plants are used. The first aim of this work was to determine the best concentration of sodium hypochlorite (0.25; 0.50 or 1.0%) and optimum time of exposition (10 and 20 min), aiming at the disinfestation of the explants of *Melaleuca alternifolia* introduced *in vitro*. Fungicide was used before the immersion in ethanol and NaOCl 1.0% for 20 min. The second objective was to evaluate the influence of MS and WPM media and their variations, semi-solid (6 agar g L⁻¹), liquid and with activated charcoal (0.2%), in the formation of axillary shoots during establishment. For both experiments, 1 cm stem segments were removed from plants from greenhouse. In the experiment of disinfestation, the best treatment was with fungicide followed by 1.0% sodium hypochlorite. This treatment resulted in the elimination of bacteria and the reduction of fungus proliferation. The establishment reached 80% of the explants. There was no significant difference between the results of the two media (MS and WPM) with regard to the amount of shoots per explant. Independently of the culture medium (MS or WPM), the highest average number of shoots per explant was observed (1,83) in the semi-solid medium without activated charcoal, followed by the solid medium with activated charcoal (1,45) and the liquid medium (1,01).

Key-words: Aromatic plant. Medicinal plant. Micropropagation. Tissue culture.

3.1 INTRODUÇÃO

A propagação clonal de um genótipo selecionado de *Melaleuca alternifolia*, oferece potencial para a obtenção de um grande número de indivíduos que produzam óleo essencial de excelente qualidade (LIST et al., 1996). Nesse sentido a micropropagação pode viabilizar esse objetivo.

As espécies lenhosas apresentam dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, principalmente quando é utilizado material vegetal proveniente de plantas adultas, pois podem apresentar infestação interna ou externa por microorganismos, que são de difícil controle (SKIRVIN, 1981; BONGA, 1982). A micropropagação só pode ocorrer se o processo de desinfestação obtiver sucesso (ALMEIDA et al., 2008).

A escolha do explante apropriado constitui o primeiro passo para o estabelecimento *in vitro* (MROGINSKI e ROCA, 1991). Teoricamente, qualquer tecido pode ser escolhido como explante, devido à totipotência que as células vegetais possuem, ou seja, a capacidade de possuírem toda a informação genética necessária para o desenvolvimento de uma planta completa (TAIZ e ZEIGER, 2004). Entretanto, isso não se verifica com as plantas lenhosas, cujos tecidos especializados apresentam dificuldade em expressar a totipotência. Por isso, os explantes normalmente utilizados para iniciar o processo são os ápices meristemáticos e os segmentos nodais, também chamados de microestacas. Estes materiais são portadores de meristemas primários apicais ou axilares, que continuam o seu crescimento e diferenciação de novas brotações com grande estabilidade genética, sendo preferidos na micropropagação.

Fatores como a sanidade da planta matriz, o tamanho dos explantes, a concentração do agente desinfestante, a assepsia dos instrumentos e do tempo de exposição ao tratamento, também influenciam a obtenção de explantes livres de contaminação (CARNEIRO et al., 1999).

Contudo, vários fatores interferem no sucesso do estabelecimento de um protocolo, dentre eles, o meio de cultura. Os meios nutritivos fornecem às plantas substâncias essenciais para o seu crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. O meio de cultura mais utilizado neste processo é o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Formulações especiais, como o meio WPM – “Woody Plant Medium” (LLOYD e McCOWN, 1980), surgem como

alternativas ao meio MS, atendendo melhor, em alguns casos, as exigências de espécies lenhosas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Nesta mesma perspectiva, o carvão ativado tem sido utilizado com mais frequência para melhorar ou regular o crescimento de plantas *in vitro* (GEORGE, 1996).

Este trabalho teve como objetivo geral o estabelecimento *in vitro* de *M. alternifolia* e como objetivos específicos, avaliar diferentes concentrações e tempos de exposição à solução de hipoclorito de sódio, bem como a influência de diferentes meios de cultura e do carvão ativado no cultivo inicial de segmentos nodais.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação de Plantas, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba - Paraná.

3.2.1 Material vegetal

As plantas matrizes foram mantidas em vasos com capacidade de 15 L, contendo uma mistura de solo e substrato Plantmax HT[®] (1:1), dentro de uma casa-de-vegetação (FIGURA 2A). O material vegetal teve origem da estaquia de plantas de *M. alternifolia* cultivadas a campo em Joinville (SC) com aproximadamente 2 anos de idade.

De acordo com a necessidade, as plantas matrizes foram irrigadas e receberam podas visando a obtenção de brotações rejuvenescidas, que foram utilizadas como fonte de explantes. A primeira poda aconteceu aproximadamente 45 dias antes da instalação do primeiro ensaio de assepsia visando o estabelecimento *in vitro*, e outras podas foram realizadas até o final dos experimentos em intervalos de 60 dias.

3.2.2 Condições de cultura *in vitro*

Todas as culturas foram mantidas em sala climatizada, equipada com lâmpadas fluorescentes do tipo “luz do dia”, com irradiância de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

3.2.3 Concentração e tempo de imersão em hipoclorito de sódio na assepsia de segmentos nodais de *M. alternifolia*

As brotações (FIGURA 2B) foram lavadas com detergente neutro e expostas à água corrente por 30 min. Em câmara de fluxo laminar, foram imersas em etanol (70% v/v) por 30 segundos, seguido da imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), em diferentes concentrações finais (0,25; 0,5 e 1,0%) e tempos de imersão (10 e 20 min), mais Tween 20[®] (0,05% v/v). Também foi aplicado um tratamento com tiofanato-metílico ($1,4 \text{ g L}^{-1}$) antes da imersão em etanol e na maior concentração de hipoclorito, durante 40 minutos. Após o contato com o agente germicida, procedeu-se quatro lavagens em água deionizada esterilizada, sendo as brotações seccionadas em segmentos nodais com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, sem ápice e folhas (FIGURA 2B).

Os segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). A cultura de segmentos permaneceu no escuro em sala de crescimento por 7 dias, sendo então transferida para luz.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* foram avaliadas as porcentagens de explantes contaminados por fungos ou bactérias, e calculada a porcentagem de sobrevivência. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por 10 tubos de ensaio contendo um segmento nodal.

3.2.4 Influência de diferentes meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de *M. alternifolia*

Neste experimento, segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento foram estabelecidos *in vitro* pelo melhor tratamento de desinfestação verificado no ensaio anterior. Foram retirados os ápices dos segmentos, que continham aproximadamente 4 gemas axilares, sendo então inoculados em diferentes meios de cultura, permanecendo em sala de crescimento, nas condições descritas no item 3.2.2.

Os tratamentos foram constituídos pelos seguintes meios de cultura: (T1) MS com 6 g L⁻¹ de ágar (Vetec[®]), (T2) MS sem ágar (líquido), (T3) MS com 2 g L⁻¹ de carvão ativado (CA) e 6 g L⁻¹ de ágar, (T4) meio mineral WPM com 6 g L⁻¹ de ágar, (T5) WPM sem ágar (líquido) e sem agitação, (T6) WPM com 2 g L⁻¹ (CA) e 6 g L⁻¹ de ágar. Em todos os meios foram acrescentadas as vitaminas e compostos orgânicos do meio MS (ANEXO 1) e 30 g L⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120°C por 20 min.

Segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio de cultura, permanecendo em sala de crescimento por 20 dias. Após este período de cultivo *in vitro*, foi avaliado o número de brotações por explante. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial 2x3 (MS e WPM x semi-sólido; líquido; semi-sólido com carvão ativado), com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por 10 tubos de ensaio contendo um segmento nodal.

3.2.5 Análise estatística

Realizou-se o teste de Bartlett para se verificar a homogeneidade entre os dados, sendo então os oriundos de porcentagem transformados para $\arcseno\sqrt{x/100}$ e os de contagem para $\sqrt{x+1}$. As médias foram submetidas à análise de variância e ao teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se para o processamento dos dados, o programa computacional SOC (Embrapa, 1990).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Concentração e tempo de imersão em hipoclorito de sódio na assepsia de segmentos nodais de *M. alternifolia*

Aos 7 dias da inoculação observou-se contaminação, sendo que a presença de contaminação bacteriana precedeu a fúngica em todos os tratamentos. Não foi observada oxidação nos segmentos desinfestados (FIGURA 2C). List et al. (1996), ao isolarem segmentos nodais de *M. alternifolia*, não comentaram a presença ou não de oxidação.

Em todas as variáveis analisadas, ocorreu diferença estatística significativa entre os tratamentos aplicados (ANEXOS 3 a 5). Os tratamentos com menores concentrações de hipoclorito de sódio (0,25%) não permitiram eliminar as contaminações, impossibilitando o estabelecimento *in vitro* dos explantes (TABELA 1).

TABELA 1 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO NA DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *Melaleuca alternifolia*, AOS 30 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*.

Concentração de NaOCl e tempo de imersão	Contaminação bacteriana (%)	Contaminação fúngica (%)	Sobrevivência (%)
0,25% por 10 min	72 a *	28 ab	0 d
0,25% por 20 min	64 a	36 a	0 d
0,5% por 10 min	46 b	40 a	14 c
0,5% por 20 min	50 b	40 a	10 c
1,0% por 10 min	30 c	40 a	30 b
1,0% por 20 min	20 c	40 a	40 b
Tiofanato-metilico + 1,0% NaOCl por 20 min	0 d	20 b	80 a
Média geral	43,1	32	24,9
CV(%)	13,9	17,6	31,8

* Médias seguidas com letra idêntica nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Observou-se que à medida que se elevou a concentração de hipoclorito de sódio, a contaminação bacteriana decresceu até anular-se completamente no tratamento que utilizou tiofanato-metílico e 1,0% de NaOCl por 20 min, embora a contaminação fúngica ainda tenha persistido, em menor grau. Percebeu-se que este tratamento eliminou totalmente bactérias e reduziu significativamente a proliferação de fungos.

Embora a contaminação por fungos tenha ocorrido em todos os tratamentos, a utilização do fungicida auxiliou de forma significativa no controle deste tipo de contaminação, possibilitando a melhor taxa de sobrevivência (80%).

No tratamento com 0,25% de NaOCl e 10 min de imersão, observou-se taxa de contaminação por fungos semelhante ao melhor tratamento. Isto provavelmente se deve ao fato da contaminação bacteriana ter levado à necrose os explantes de forma mais rápida, visto que era este tipo de contaminação que ocorria inicialmente.

A contaminação fúngica atingiu valores de até 40 % no presente estudo. Semelhantemente, no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais do híbrido *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, Brondani (2008) constatou que a porcentagem de contaminação fúngica, independente do clone avaliado, foi de 41,33%, sendo responsável pela maior perda de material durante a fase de estabelecimento.

Plantas mantidas em viveiro protegido ou casa-de-vegetação apresentam-se também como fontes potenciais de microorganismos, que podem tornar-se limitantes para os procedimentos de cultivo *in vitro* (MEDEIROS, 1999), o que foi observado neste estudo.

List et al. (1996) ao estabelecerem um protocolo de micropropagação para melaleuca, utilizaram para a desinfestação de segmentos nodais, hipoclorito de sódio a 1% por 20 min. Os autores não relataram a porcentagem de sobrevivência que obtiveram com este método de assepsia, que foi o segundo melhor tratamento encontrado no presente trabalho.

Brondani (2008) utilizou segmentos nodais de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* com tamanho médio de 1,5 cm. Estes foram imersos em solução a 70% de etanol (v/v) por 15 s e submetidos a soluções de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% (v/v) de NaOCl acrescidas de Tween 20[®] (0,05% v/v) durante 10 minutos. A porcentagem de estabelecimento alcançou valores médios acima de 45%, tanto na menor quanto na

maior concentração de NaOCl utilizada. Diferentemente do presente estudo, a contaminação bacteriana resultou em pouco efeito na fase de estabelecimento.

Em *Eucalyptus dunnii*, Almeida et al. (2008) verificaram que o processo de desinfestação de segmentos nodais apresentou melhores resultados nas concentrações de 1,5% e 2,0% de NaOCl, onde obtiveram maiores porcentagens de explantes estabelecidos, aproximadamente 40%. A concentração de 1,0% de NaOCl proporcionou uma porcentagem de desinfestação de 10%, indicando que os resultados encontrados no presente estudo são satisfatórios, considerando a dificuldade de desinfestar explantes de espécies lenhosas.

Já para a desinfestação de segmentos nodais de mirtilo, Erig e Schuch (2005) utilizaram hipoclorito de sódio na concentração de 2 - 2,5% de cloro ativo (água sanitária comercial) durante 5 minutos, e obtiveram valores de desinfestação satisfatórios, sendo que a contaminação fúngica e bacteriana ocorreu em 0,96% e 7,26% dos explantes, respectivamente. Neste caso, as mudas doadoras de explantes, mantidas em vasos na casa-de-vegetação, foram pulverizadas semanalmente até 45 dias antes da coleta das brotações, com o antibiótico Agrimicina[®] (oxitetraciclina e sulfato estreptomicina) e os fungicidas Cercobin[®] (tiofanato-metílico) e Kumulus[®] (enxofre), nas doses de 2,4 g L⁻¹, 0,7 g L⁻¹ e 3,0 g L⁻¹ respectivamente. Isto demonstra a influência dos tratamentos sanitários na planta matriz sobre o comportamento *in vitro* dos explantes.

Grattapaglia e Machado (1998) ressaltaram que o estado fisiológico da planta de onde são retirados os explantes apresenta grande influência no posterior comportamento das culturas. No presente estudo, não foram realizadas pulverizações sobre a planta matriz, em casa-de-vegetação, ocorrendo somente um tratamento de aplicação de fungicida nos explantes antes do contato com o agente desinfestante, cuja taxa de estabelecimento foi a melhor encontrada.

Em termos gerais, o estabelecimento da espécie foi satisfatório, não havendo ocorrência de oxidação, podendo ainda ser otimizado por aplicação de fungicida na planta matriz.

3.3.2 Influência de diferentes meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de *M. alternifolia*

No presente trabalho, não houve diferença significativa entre o meio MS e WPM, nem interação entre as suas variações (com carvão ativado, com e sem ágar) com relação à quantidade de brotos formados por explante após 30 dias de cultivo *in vitro*. Ambos os meios produziram em média 1,4 brotos por explante (ANEXO 6).

Analisando o efeito da adição de carvão ativado e ágar, independentemente do meio de cultura, observou-se diferença estatística entre os resultados, sendo que o meio semi-sólido proporcionou o maior número médio de brotações por explante, seguido do meio com carvão ativado e o meio líquido (TABELA 2).

TABELA 2- EFEITO DO ÁGAR E DO CARVÃO ATIVADO NOS MEIOS MS E WPM NO NÚMERO E BROTAÇÕES EM SEGMENTOS NODAIS DE *M. ALTERNIFOLIA*, AOS 20 DIAS DE CULTIVO.

Característica do meio de cultura (MS e WPM)	Número médio de brotos por explante
Semi-sólido sem CA	1,83 a
Semi-sólido com CA	1,45 b
Líquido	1,01 c
CV (%)	4,2

* Médias seguidas com letras idênticas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Devido ao custo que o ágar representa na elaboração do meio de cultura, são interessantes estudos que visem identificar a influência deste componente nas fases da micropropagação. Segundo Grattapaglia e Machado (1990) o ágar pode, conforme o teor de impurezas, modificar a composição química do meio de cultura, além de influenciar o potencial mátrico, alterando a disponibilidade de água, nutrientes e reguladores vegetais no meio de cultura. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos, esse componente parece não ter influenciado o cultivo inicial de *M. alternifolia*, onde o meio com a presença de ágar mostrou-se superior ao meio líquido para o desenvolvimento de brotações.

Além disto, para algumas espécies lenhosas, o meio de cultura MS não se mostrou eficiente e composições mais diluídas em macronutrientes têm sido utilizadas com sucesso (HARRY e THORPE, 1994). Contudo, o meio de cultura

WPM não mostrou superioridade em relação ao MS no estabelecimento *in vitro* de *Melaleuca*.

Rocha et al. (2005), ao testarem a influência do ágar no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de pêssego (com 1,0 cm de comprimento), verificaram que o meio MS, com 3,33 μM de BAP + 0,13 μM de GA₃ + 2,85 μM de AIB, semi-sólido (6,5 g L⁻¹ de ágar) foi significativamente superior ao meio líquido com relação a porcentagem de estabelecimento, que foi de 99,6 e 50,2% respectivamente. Constatou-se que o comprimento e o número médio das folhas foram superiores também no meio de cultura com a presença do ágar.

Neste mesmo sentido, Erig e Schuch (2005) ao testarem o estado físico do meio de cultura WPM no estabelecimento *in vitro* de mirtilo, verificaram que o meio semi-sólido (6 g L⁻¹), proporcionou de forma significativa a maior taxa de estabelecimento (79,23%) comparada ao meio de cultura líquido (0,74%), demonstrando que a presença do ágar influencia de forma expressiva esta fase inicial da micropropagação.

No estabelecimento *in vitro*, o cultivo inicial em meio líquido de *M. alternifolia* mostrou-se viável, não sendo observada a ocorrência de hiperhidricidade. Entretanto o número de brotações por explante foi inferior ao dos meios semi-sólidos.

Outro fator que pode estar relacionado ao desenvolvimento inferior que o meio líquido proporcionou, é a menor aeração que ocorreu nessa condição. Geralmente os frascos de cultura com meio líquido são submetidos à agitação, o que não ocorreu no presente estudo. Os explantes ficaram em parte submersos no meio de cultura dentro dos tubos de ensaio. Essa observação confirma a de MURASHIGE (1974) que afirma que os explantes afundam quando em meio líquido estacionário prejudicando a troca gasosa.

Os segmentos que permaneceram em meio com carvão ativado apresentaram números de brotações intermediários aos do meio semi-sólido sem carvão e líquido. A adsorção de compostos fenólicos liberados pelo explante é uma das propriedades que o carvão ativado possui e que pode ser útil na micropropagação. No presente estudo, a liberação destes compostos não foi expressiva, ocorrendo somente ao redor da base dos explantes, não comprometendo o seu desenvolvimento.

O menor desenvolvimento das brotações observada no meio semi-sólido com carvão em relação ao sem carvão ativado pode ser devido ao fato desta

substância também adsorver nutrientes do meio de cultura, desequilibrando a faixa ideal da concentração destes nutrientes. O carvão ativado é comumente usado em meios de cultura. Adicionado ao meio de cultura pode promover ou inibir o crescimento *in vitro* dependendo da espécie e tecido usado. Os efeitos do carvão ativado podem ser atribuídos ao estabelecimento de um ambiente escuro, adsorção de substâncias inibidoras e/ou indesejáveis, adsorção de reguladores vegetais e outros compostos orgânicos (PAN e STADEN, 1998).

M. alternifolia demonstrou melhor desenvolvimento em meio semi-sólido sem carvão, possivelmente devido ao fato da espécie necessitar de menor concentração de nutrientes nesta fase inicial, já que Caldas et al. (1990) observou a existência de um excesso nas concentrações de macro e microelementos no meio de cultura líquido. Além disto, para *M. alternifolia* a oxigenação parece ser um fator importante para a espécie nesta fase inicial do cultivo *in vitro*.

Considerando que um dos objetivos desta fase inicial é a produção de material vegetal para que a fase de multiplicação seja viável e eficiente, se faz necessário a escolha do meio de cultura que possibilite maior número de brotos, o que ocorreu com o meio de cultura semi-sólido.

3.4 CONCLUSÕES

De acordo com as condições em que o presente trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

- O estabelecimento *in vitro* de *Melaleuca alternifolia* é possível e pode ser realizado pela imersão de segmentos nodais em fungicida tiofanato-metílico 2 g L⁻¹ por 40 min, etanol 70% por 30 segundos e NaOCl 1% por 20 min.
- O cultivo inicial pode ser realizado em meio de cultura MS ou WPM solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar.

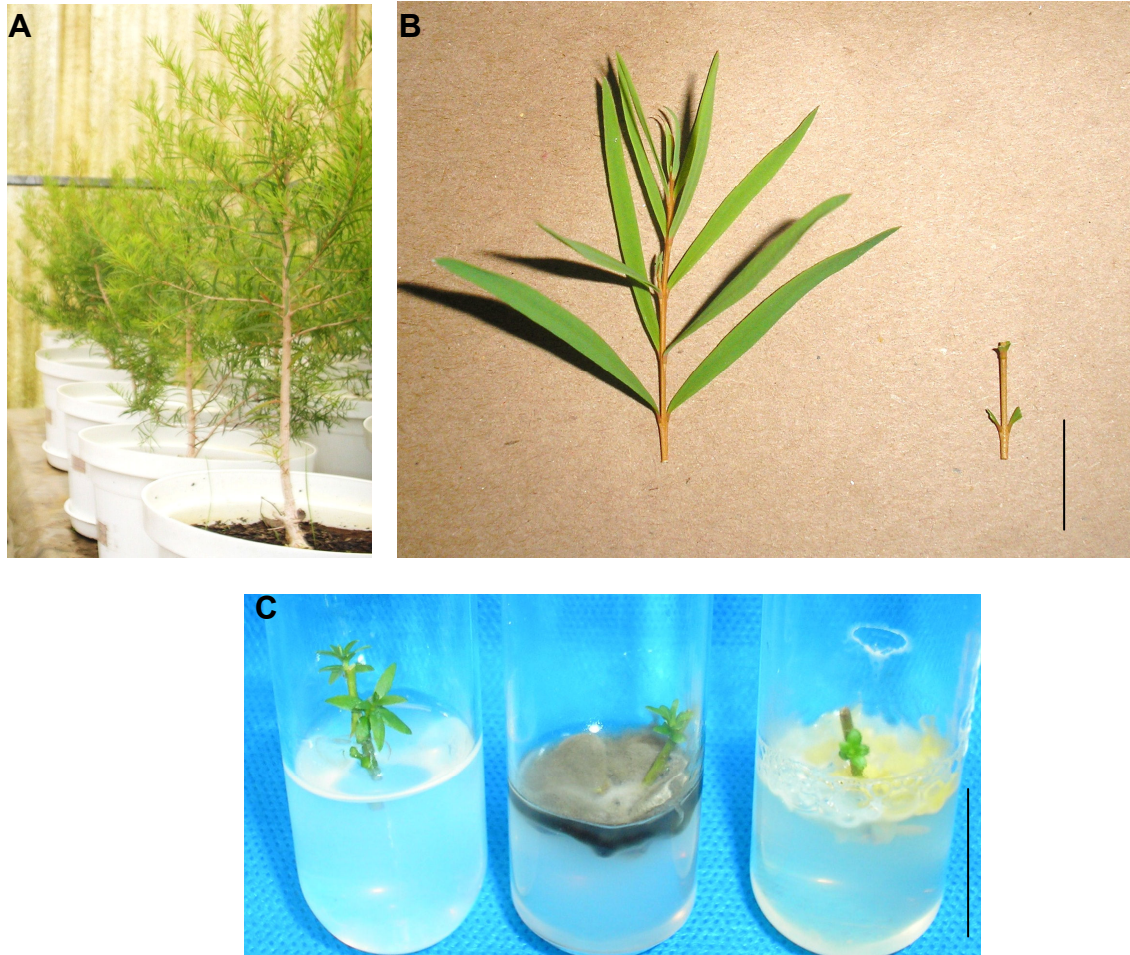


FIGURA 2- A.PLANTAS MATRIZES DOADORAS DOS EXPLANTES, EM CASA-DE- VEGETAÇÃO. B.SEGMENTOS NODAIS UTILIZADOS COMO EXPLANTE. C. SEGMENTOS NODAIS DE *M. alternifolia* APÓS 30 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*: SEM CONTAMINAÇÃO, COM CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E APRESENTANDO CONTAMINAÇÃO BACTERIANA, DA ESQUERDA PARA A DIREITA, RESPECTIVAMENTE. BARRA: 1 CM.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. R.; MARTINS, C. R.; DUTRA, L. F. Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* visando estabelecimento *in vitro*. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 15, n. 1, p. 54-60, 2008.
- BONGA, J. M. **Tissue culture techniques**. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Tissue culture in forestry**. The Hague: Nijhoff, 1982. p. 4-35.
- BRONDANI, G. E. **Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage X *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPACNPH, 1990. p. 37-69.
- CARNEIRO, I. F.; ZICA, L. F.; CHAVES, L. J. Comparação de métodos de descontaminação usados na fase inicial do estabelecimento em cultura *in vitro* de banana. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 29, n. 2, p. 89-92, 1999.
- EMBRAPA. Núcleo Tecnológico para Informática. SOC – **Software Científico**. Campinas, 1990.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 6, n. 1-2, p. 91-96, 2005.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 2 in practice**. 2. Ed. Somerset: Exegetics, 1996. p. 575-638.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 99-169.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.
- HARRY, I. S.; THORPE, T. A. *In vitro* culture of forest trees. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. p. 539-560.
- LIST, S. E.; BROWN, P. H.; LOW, C. S.; WALSH, K. B. A micropropagation protocol for *Melaleuca alternifolia* (tea tree). **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 36, p. 755-760, 1996.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagator's Society. Proceedings**, Seattle, v. 30, p. 421-427, 1986.

MEDEIROS, C. P. C. **Indução *in vitro* de respostas morfogênicas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.)**. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

MROGINSKI, L. A.; ROCA, W. M. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p. 19-40.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Columbus, v.25, p.135-166, 1974.

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

PAN, M. J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, p. 155-163, 1998.

ROCHA, P. S. G.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; MISTURA, C. C. Tipo de explante e estado físico do meio no estabelecimento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* cv MR.S. 2/5. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 10, n. 2, 2005.

SKIRVIN, R. M. Fruit Crops. In: CONGER, B. V. **Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques**. Boca Raton: CRC Press, 1981. p. 51-139.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre, Artmed, 2004. 719p.

4. MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Melaleuca alternifolia*

RESUMO

A disponibilidade de trabalhos referentes à micropropagação de *M. alternifolia* é bastante restrita na literatura, fazendo-se necessário o estudo de vários fatores que podem interferir durante o processo. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo comparar dois meios de cultura (MS e WPM) com e sem ágar, bem como diferentes concentrações de BAP durante a fase de multiplicação de gemas. Para tanto, explantes constituídos de brotações retiradas de segmentos nodais de *M. alternifolia* foram inoculados nos meios de cultura MS e WPM, com diferentes concentrações de BAP (0; 0,55; 1,11; 2,22; 3,33; e 4,44 μM) com e sem ágar (6 g L⁻¹) e mantidos em sala de crescimento por 60 dias. Após 30 e 60 dias, foram avaliados o número de brotos por explante, a massa fresca e seca (g), a porcentagem de oxidação, além de ser observada a hiperhidricidade. Durante a etapa de multiplicação *in vitro* de *M. alternifolia*, os explantes respondem de forma diferenciada quanto à presença de ágar e concentrações de BAP nos meios WPM e MS. Os meios de cultura líquidos favoreceram a ocorrência de oxidação nos explantes, sendo crescente à medida que se aumentou a concentração de BAP. O meio de cultura MS líquido contendo 1,11 μM de BAP proporcionaram o maior número médio de brotações por explante (11,8).

Palavras-chave: Ágar. BAP. Meio de cultura. Micropropagação.

IN VITRO MULTIPLICATION OF *Melaleuca alternifolia***ABSTRACT**

The number of studies about *M. alternifolia* micropropagation reflects the scarcity of publications in this area and a series of factors which interfere in the process need to be studied. The purpose of this study was to compare two culture media (MS and WPM) with or without agar, as well as different BAP concentrations during the shoot multiplication. Shoots (30-day old) were removed from nodal segments of *M. alternifolia* inoculated on MS and WPM culture media supplemented with BAP (0; 0.55; 1.11; 2.22; 3.33 and 4.44 μM), with or without agar (6g L^{-1}) and kept in a growth room for 60 days. After 30 and 60 days, the shoot number per explant, fresh and dry mass (g), oxidation percentage, and hyperhydricity were evaluated. During *in vitro* multiplication of *M. alternifolia* the explants responses to agar presence and BAP concentrations on media WPM and MS were different. Liquid culture media (MS or WPM) favored the occurrence of oxidation of the explants and high concentrations of BAP promoted highest oxidation rate. The highest shoot number per explant (11.8) was reached with 1.11 μM BAP in liquid MS medium.

Key-words: Agar. BAP. Culture media. Micropropagation.

4.1 INTRODUÇÃO

A disponibilidade de trabalhos referentes à micropropagação de *M. alternifolia* é bastante restrita na literatura, sendo interessante e de grande valia o estudo de vários fatores que podem interferir durante todo este processo. Na micropropagação, a fase de multiplicação requer estudos relacionados à escolha do meio de cultura e regulador vegetal (tipo e concentração) mais favorável ao desenvolvimento de brotações múltiplas.

A escolha adequada do meio de cultura é um fator relevante para a micropropagação, devido ao importante papel dos componentes minerais no processo de regeneração dos explantes (RAMAGE e WILLIAMS, 2002). Além dos sais minerais, os nutrientes essenciais do meio de cultura incluem uma fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento (GAMBORG e SHYLUK, 1981).

O meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) foi utilizado por List et al. (1996) em todo o processo de micropropagação de *M. alternifolia*. Entretanto, formulações especiais, como o meio WPM – “Woody Plant Médium” (LLOYD e McCOWN, 1980), surgem como alternativas ao meio MS, atendendo melhor, em alguns casos, as exigências de espécies lenhosas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; VENGADESAN et al., 2002).

List et al. (1996) estudaram o efeito das citocininas benzilaminopurina (BAP) e cinetina (CIN) e da combinação de ambas em meio MS, visando à indução da proliferação de gemas axilares em segmentos nodais de *M. alternifolia*. O melhor resultado obtido foi com 4,5 μ M de BAP, sendo superior ao encontrado com a cinetina e esta combinada à BAP. Nestas condições, foi possível produzir em média, ao final de 9 semanas de cultivo, 5,57 brotações por segmento nodal.

Atualmente, estudos referentes à não utilização do ágar durante a micropropagação vêm sendo realizados, visando à diminuição do custo do meio de cultura. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo comparar dois meios de cultura (MS e WPM) e a presença do ágar, bem como diferentes concentrações de BAP durante a fase de multiplicação de gemas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-Paraná.

4.2.1 Material vegetal

Os explantes utilizados nos experimentos de multiplicação foram brotações axilares retiradas de segmentos nodais de *M. alternifolia* recém estabelecidos *in vitro*, oriundos de plantas matrizes mantidas em casa-de-vegetação.

Para o estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais, brotações foram seccionadas, tendo seus ápices e folhas retirados. Após a desinfestação com etanol 70% (v/v) e 1,0 % de NaOCl, e tratamento com tiofanato-metílico (2 g L^{-1}) por 40 min, o material vegetal foi seccionado em segmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento (contendo em média 2 nós com 4 gemas), sendo então inoculados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) semi-sólido, geleificado com 6 g L^{-1} de ágar (Vetec®).

Após 20 dias de cultivo, as brotações axilares de cada segmento (com cerca de 0,5 cm de altura e 17 mg de massa fresca) apresentando em média 3 folhas, foram inoculadas em frascos de cultivo com aproximadamente 20 mL dos meios de cultura líquido (onde os explantes ficaram soltos na solução nutritiva) e semi-sólido, que constituíram os tratamentos do presente experimento.

4.2.2 Condições de cultura *in vitro*

As culturas foram realizadas em frascos de vidro de 6 cm de diâmetro e 9 cm de altura, vedados com tampa de polipropileno rígido, sendo mantidas em sala climatizada, equipada com lâmpadas fluorescentes do tipo “luz do dia”, irradiância de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{ C}$.

4.2.3 Efeito da utilização do ágar e concentrações de BAP em diferentes meios de cultura

Brotações originadas de segmentos nodais de *M. alternifolia*, com 20 dias de cultivo em meio de cultura inicial, MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) semi-sólido, foram inoculadas nos meios de cultura MS e WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), adicionados das vitaminas e compostos orgânicos do meio MS (ANEXO 1) e de várias concentrações de BAP (0; 0,55; 1,11; 2,22; 3,33 e 4,44 μM), suplementados ou não com ágar (Vetec[®]) (6 gL^{-1}).

Os explantes foram inoculados em frascos de cultivo e mantidos em sala de crescimento por 60 dias. Foram realizados subcultivos aos 30 e 60 dias, totalizando 2 subcultivos, onde a brotação foi isolada e transferida para o mesmo meio de cultura. A cada subcultivo foram avaliadas as variáveis número de brotos novos por explante, massa fresca e seca (g), porcentagem de oxidação, além de ser observada a hiperhidricidade. Durante a contagem do número de brotos por explante, não foi considerada a brotação inicial, sendo somente as novas brotações formadas contabilizadas.

Para a determinação da massa seca, amostras (10 tufos por tratamento) foram retiradas, pesadas, e permaneceram em estufa por 48h à 80°C. Após este período procedeu-se nova pesagem do material vegetal.

4.2.4 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, num arranjo tri fatorial $2 \times 2 \times 6$, considerando dois subcultivos (30 e 60 dias), o estado físico do meio (semi-sólido e líquido) e seis concentrações de BAP (0; 0,55; 1,11; 2,22; 3,33 e 4,44 μM) para os meios de cultura MS e WPM. Cada tratamento apresentou cinco repetições de cinco explantes cada. Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett para verificar a homogeneidade, sendo então os oriundos de porcentagem transformados para $\arcseno \sqrt{x/100}$ e os de contagem para $\sqrt{x+1}$. As médias foram submetidas à análise de variância e ao teste de Duncan ao nível de 5% de

probabilidade de erro. Utilizou-se para o processamento dos dados, o programa computacional SOC (Embrapa, 1990).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Experimento 1: Meio de cultura WPM

Com relação à variável número de brotos novos por explante, a interação entre os fatores consistência do meio de cultura WPM e concentrações de BAP foi significativa (ANEXO 7). Não houve diferenças significativas entre os dois subcultivos em relação ao número médio de brotos, sendo apresentada neste caso a média da variável para as duas subculturas (TABELA 3).

TABELA 3 - NÚMERO MÉDIO DE BROTOS POR EXPLANTE E PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO NA MULTIPLICAÇÃO DE *M. alternifolia*, AOS 30 E 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM (médias entre os dois subcultivos).

BAP (μM)	Número de brotos		Oxidação (%)	
	Semi-sólido	Líquido	Semi-sólido	Líquido
0,00	0,0 eA	0,0 dA	0,0 cB	52,5 deA
0,55	5,5 aA	4,7 aB	5,5 cB	44,5 eA
1,11	4,5 bA	1,0 bcB	4,5 cB	70,5 bA
2,22	3,6 cA	1,2 bB	16,0 bB	60,5 cdA
3,33	3,4 cA	1,0 bcB	31,5 aB	64,5 bcA
4,44	2,7 dA	0,9 cB	40,0 aB	82,5 aA
CV(%)	33,0		50,9	

Médias seguidas por letras minúsculas idênticas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A concentração de 0,55 μM foi superior estatisticamente as demais, proporcionando o maior número de novas brotações por explante, tanto no meio semi-sólido (5,5), quanto no meio líquido (4,7). O meio semi-sólido apresentou-se superior ao meio líquido em todas as concentrações testadas, salvo a testemunha que não apresentou novas brotações em ambas as consistências.

O melhor desempenho do meio semi-sólido pode estar relacionado ao fato dos explantes neste tipo de meio possuírem maior aeração que os mantidos em meio líquido, que não sofreu agitação durante todo o período de cultivo. Murashige (1974) afirma que os explantes que ficam submersos quando submetidos ao cultivo

em meio líquido estacionário, são prejudicados quanto à troca gasosa. A absorção de nutrientes e de reguladores vegetais pode ter sido influenciada por essa falta de aeração.

Além do exposto, a superioridade do meio sólido sobre o meio líquido pode ser devida ao potencial osmótico menos negativo do meio líquido, em relação ao meio sólido, ocasionando maior perda de água da célula para o meio de cultura e causando estresse osmótico na célula (George, 1993) ou estresse hídrico.

Observou-se que o número de brotações se reduziu significativamente à medida que a concentração de BAP aumentou, em ambas as consistências do meio de cultura. Em todos os tratamentos, as brotações cultivadas em meio de cultura WPM semi-sólido ou líquido apresentaram brotações reduzidas, com folhas pequenas, e aparência clorótica e oxidada (FIGURA 3 A à D).

Em cinamomo (*Melia azedarach* L.), Cabel (2006) também encontrou sintomas de clorose foliar durante a fase de multiplicação dos explantes submetidos ao cultivo em meio de cultura WPM semi-sólido (6 g L⁻¹ de ágar). As brotações formadas apresentavam-se pouco vigorosas e com crescimento lento, conforme o observado em *M. alternifolia*. De forma semelhante, em canjarana, Rocha et al. (2007) também verificaram a ocorrência de clorose foliar em brotações mantidas em meio de cultura WPM, a partir do 3º subcultivo.

Além disto, a análise estatística mostrou que a oxidação diferiu estatisticamente em função da consistência do meio WPM, sendo a interação entre consistência e concentrações de BAP significativa (ANEXO 10). Verificou-se, de uma maneira geral, a presença de oxidação ao redor das folhas de todas as brotações mantidas no meio WPM, sendo que na sua fase líquida, em todas as concentrações de BAP testadas, ela foi superior do que na fase semi-sólida. No meio de cultura líquido suplementado com 4,44 µM de BAP, a incidência desse fenômeno foi a maior encontrada nesse experimento (82,5%) (TABELA 3).

Na produção de massa fresca houve diferença significativa em relação às concentrações de BAP e interação entre o tipo de meio e as concentrações de BAP (ANEXO 8). De maneira geral, as menores concentrações (0,55 e 1,11 µM) produziram um maior valor de massa fresca e seca que as demais (TABELA 4), provavelmente em virtude de ter ocorrido maior produção de brotos nessas condições.

Em relação à consistência do meio de cultura, os valores de massa fresca nas menores concentrações de BAP foram superiores no meio líquido, possivelmente pela maior absorção de água que esta condição favorece, refletindo na massa do explante.

TABELA 4 – MASSA FRESCA E MASSA SECA DE *M. alternifolia*, AOS 30 E 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM (médias entre os dois subcultivos).

BAP (μM)	Massa fresca (mg)		Massa seca (mg)	
	Semi-sólido	Líquido	Semi-sólido	Líquido
0,00	39 aB	64 aA	7,5 aA	7,5 aA
0,55	37 aB	53 bA	7,3 aA	2,1 bB
1,11	38 aA	26 cB	7,5 aA	0,5 cB
2,22	20 bA	15 dA	4,1 bA	1,0 bcB
3,33	20 bA	16 dA	4,3 bA	0,6 cB
4,44	17 bA	10 dA	3,3 bA	0,4 cB
CV(%)	51,7		58,9	

Médias seguidas por letras minúsculas idênticas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A variável massa seca apresentou médias superiores, independente da concentração de BAP utilizada, no meio de cultura semi-sólido (TABELA 4 e ANEXO 9). Esse dado comprova a hipótese que grande parte da massa fresca encontrada nos explantes cultivados em meio líquido é decorrente da quantidade de água absorvida pelo explante, não sendo necessariamente pelo aumento de sua biomassa.

4.3.2 Experimento 2: Meio de cultura MS

Houve diferença estatística significativa para o número médio de brotos por explante no meio de cultura MS em função das concentrações de BAP e a interação entre elas e o tipo de meio (ANEXO 11). Semelhantemente ao meio de cultura WPM, houve uma tendência de diminuição do surgimento das brotações à medida que a concentração de BAP aumentava (TABELAS 3 e 5), exceto para a concentração de 1,11 μM que proporcionou, no meio líquido, a maior média de brotos encontrada neste estudo (11,82). Fantini Junior e Graça (1990) e Dibax (2007) também observaram decréscimos da taxa de multiplicação de *Eucalyptus saligna* à medida que a concentração de BAP aumentou.

TABELA 5 - NÚMERO MÉDIO DE BROTOS E PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO NA MULTIPLICAÇÃO DE *M. alternifolia*, AOS 30 E 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA MS (médias entre os dois subcultivos).

BAP (μM)	Número de brotos		Oxidação (%)	
	Semi-sólido	Líquido	Semi-sólido	Líquido
0,00	0,0 eA	0,0 dA	0 bA	5,2 cA
0,55	5,6 aA	3,2 cB	0 bA	4,8 cA
1,11	5,4 aB	11,8 aA	0 bA	6,0 cA
2,22	4,7 bB	5,1 bA	4 bA	4,0 cA
3,33	4,0 cA	3,2 cB	4 bB	65 bA
4,44	3,3 dA	1,0 dB	12 aB	100 aA
CV(%)	26,4		79,5	

Médias seguidas por letras minúsculas idênticas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

As concentrações de 0,55 e 1,1 μM de BAP proporcionaram maior número de brotos (5,6 e 5,4, respectivamente) no meio de cultura MS semi-sólido. Entretanto, a concentração de 1,11 μM de BAP foi a que apresentou melhor resultado no meio líquido, sendo superior ao meio semi-sólido, favorecendo a produção de 11,8 brotações por explante.

No presente estudo, o vigor das brotações originadas no meio de cultura MS foi superior (FIGURA 3E) ao das brotações cultivadas em meio WPM, independente da concentração de BAP utilizada, mostrando que há diferenças na resposta dos explantes de acordo com o meio de cultura. Em canjarana (*Cabralea canjerana*), Rocha et al. (2007), ao testarem os dois meios de cultura, verificaram que o meio WPM proporcionou o menor número de brotos por explante (dados não apresentados pelos autores) e a maior taxa de multiplicação quando adicionado de 2,25 μM de BAP (1,77 no 2º subcultivo). Já no caso de *Acacia* (VENGADESAN et al., 2002) e *Anacardium occidentale* (MNENEY e MANTELL, 2002), o meio de cultura MS apresentou melhores resultados que o WPM para indução de brotos.

A ausência de ágar no meio MS proporcionou brotações vigorosas e com características físicas favoráveis para a manipulação, quando comparado ao meio WPM líquido (FIGURA 5B e FIGURA 6). Além disto, o meio líquido favoreceu, em certas concentrações de BAP, o surgimento de brotações mais alongadas (FIGURA 3F) e individualizadas dentro dos tufos. Este aspecto deve ser levado em conta visto que o mesmo facilita a manipulação e posterior isolamento dos explantes para a fase de enraizamento. Diante deste fato observado, não houve fase de alongamento para *Melaleuca* no presente trabalho.

List et al. (1996) testaram diferentes concentrações de BAP (0,0045; 0,045; 0,45 e 4,5 μM) no meio de cultura MS semi-sólido (8 g L^{-1} de ágar), na fase da multiplicação de explantes constituídos por segmentos nodais de *M. alternifolia*. O melhor resultado encontrado foi com 4,5 μM de BAP, que induziu a formação de 5,5 brotações em média por segmento, ao final de 9 semanas de cultivo *in vitro*. Já no presente experimento, ao final de 8 semanas de cultivo em condições similares, cada explante, constituído por uma brotações isolada, produziu em média 3,3 brotações. Entretanto, a utilização de 1,11 μM de BAP em meio líquido, foi superior ao meio semi-sólido e aos resultados encontrados por List et al. (1996), favorecendo a produção de 11,8 brotações por explante.

O meio líquido pode ter favorecido a absorção de nutrientes e conseqüentemente, facilitado a absorção de BAP, pois de acordo com a observação feita por Costa e Zaffari (2005), o meio líquido permite maior velocidade de difusão e absorção mais eficiente de nutrientes.

Domingues et al. (1995) estudaram também a influência do estado físico do meio de cultura MS durante a multiplicação de ápices caulinares de bananeira cv. maçã. Foram testados o meio líquido com agitação (65 rpm), sem agitação e o meio semi-sólido (6,5 g L^{-1}). Os explantes cultivados em meio com agitação e semi-sólido foram os que apresentaram maiores médias em relação ao número de brotos por explante (1,56 e 1,20, respectivamente) quando comparadas com o meio líquido sem agitação (0,49 brotos). Os autores mencionam que a falta de aeração que ocorre no meio líquido sem agitação pode ter provocado essa redução na capacidade de brotação dos explantes, o que foi verificado também em algumas concentrações de BAP utilizadas, no mesmo meio de cultura líquido durante a multiplicação de *M. alternifolia*.

Contudo, a concentração de 1,1 μM de BAP, a formulação salina do meio de cultura MS e a ausência de ágar, mesmo em meio de cultura desprovido de agitação, mostraram-se favoráveis a indução de brotações múltiplas em *M. alternifolia*.

Os comportamentos distintos observados, no presente trabalho, entre os dois meios de cultura testados (MS e WPM) podem estar relacionados também às peculiaridades existentes entre eles. Sabe-se que o meio WPM possui apenas 45% da força iônica total do meio MS (NUNES et al., 2002). O meio MS contém 94,21 mM de sais e o WPM 41,06 mM, além de concentrações menores de nitrato (MS 39,4

mM; WPM 9,71 mM) e amônio (MS 20,61 mM; WPM 4,94 mM. (ANEXO 2). Com isso, o meio WPM possui uma baixa concentração de nitrogênio total (14,71 mM) comparado ao MS (60,01 mM). Schottz (2003) verificou o efeito de diferentes soluções minerais sobre a clorose durante o cultivo de tecidos *in vitro* de mogno e verificou que o WPM provocou os maiores índices, juntamente com o meio B5, que possui menores concentrações de nitrogênio. O mesmo efeito foi verificado nos explantes de *M. alternifolia* mantidos em meio WPM.

O meio básico WPM (Woody Plant Medium) foi desenvolvido para cultura de brotações de plantas lenhosas e apresenta $\frac{1}{4}$ das concentrações de NO_3^- e NH_4^+ do meio MS, além de possuir menos potássio e um alto nível de íons sulfato. Entretanto, para cada tipo de espécie, cultivar e explante, o meio mais adequado e eficiente é variável. Para determinar qual o melhor meio de cultura deve-se realizar diversos ensaios (BRUM, 2001). Além disto, o meio de cultura WPM em relação ao MS possui uma concentração reduzida de cloro, manganês, além de não conter cobalto e iodo. Possivelmente, esses elementos são importantes para o desenvolvimento de *M. alternifolia*.

Entretanto, na multiplicação *in vitro* de algumas espécies lenhosas, o meio WPM tem mostrado resultados interessantes. Em caixeta (*Didymopanax morototoni*), Mantovani et al. (1999) obtiveram os melhores resultados de multiplicação de brotações com o meio WPM quando comparado ao meio MS. Neste caso, o meio WPM, na presença ou ausência de citocinina, proporcionou maior porcentagem de explantes com novas brotações (36,7%) em relação ao meio MS (18,3%). Da mesma forma, a porcentagem de brotações com folhas maiores que 10 mm de comprimento, foi maior no meio WPM (50,0%) do que no meio MS (18,2%). O autor sugere que há uma inter-relação entre os sais inorgânicos e os reguladores vegetais, que pode resultar em diferentes respostas quanto à capacidade de multiplicação.

O meio líquido favoreceu a ocorrência de oxidação nos explantes nos dois meios testados (MS e WPM). No meio MS líquido esse fenômeno ocorreu em grande parte dos explantes, diferentemente do mesmo meio na fase semi-sólida. Verificou-se que a oxidação foi crescente à medida que a concentração de BAP aumentava em ambos os casos, como mostram as TABELA 3 e 5.

Em relação à massa fresca e seca, o meio MS líquido adicionado de 1,1 μM de BAP apresentou as maiores médias, 418 mg e 167 mg, respectivamente (TABELA 6). Elas foram superiores estatisticamente às médias encontradas no meio

semi-sólido, para a mesma concentração. Possivelmente esse resultado seja em virtude da alta produção de brotações verificada nessa condição.

TABELA 6 – MASSA FRESCA E MASSA SECA DE *M. alternifolia*, AOS 30 E 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA MS (médias entre os dois subcultivos).

BAP (μM)	Massa fresca (mg)		Massa seca (mg)	
	Semi-sólido	Líquido	Semi-sólido	Líquido
0,00	80 cA	39,0 cB	22 bA	6,0 eA
0,55	146 aA	155 bA	29 abB	106 cA
1,11	128 abB	418 aA	44 aB	167 aA
2,22	80 cB	305 aA	15 bB	125 bA
3,33	89 bcB	198 bA	16 bA	28 dA
4,44	82 cA	17,0 cB	7,0 bA	5,0 fA
CV(%)	52,6		76,3	

Médias seguidas por letras minúsculas idênticas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Correia et al. (1995) testaram meio de cultura JADS líquido e sólido na fase de multiplicação de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* durante 42 dias de cultura e encontraram as maiores produções de massa fresca e seca no meio semi-sólido. Os autores relataram a ocorrência de hiperhidricidade nos explantes mantidos em meio líquido, o que pode explicar a ocorrência de maior produção de massa seca nos explantes mantidos em meio semi-sólido. Este fenômeno não foi observado nos explantes de *M. alternifolia* mantidos em meio líquido.

4.4 CONCLUSÕES

De acordo com as condições em que o presente trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

- Concentrações elevadas de BAP inibem a formação de novas brotações em *M. alternifolia*.
- Os meios de culturas MS e WPM líquidos favorecem a ocorrência de oxidação nos explantes.
- O meio de cultura WPM favorece a ocorrência de clorose nos explantes de *M. alternifolia*.
- O meio de cultura MS líquido contendo 1,11 μM de BAP, possibilita a formação de maior número médio de brotações (11,8) por explante.

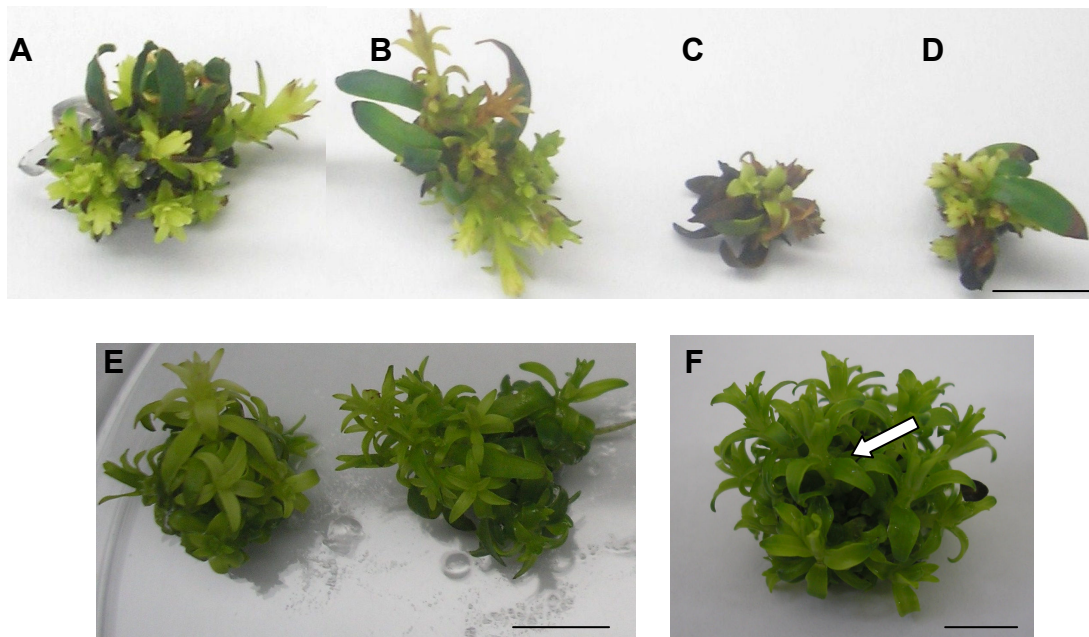


FIGURA 3- ASPECTO DAS BROTAÇÕES DE *M. alternifolia* MANTIDAS POR 30 DIAS EM MEIO DE CULTURA WPM: A. SEMI-SÓLIDO COM 0,55 μM DE BAP. B. LÍQUIDO COM 0,55 μM DE BAP. C. LÍQUIDO COM 1,11 μM DE BAP. D. LÍQUIDO COM 2,22 μM DE BAP. E. ASPECTO DAS BROTAÇÕES DE *M. alternifolia* AOS 30 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA MS LÍQUIDO CONTENDO 0,55 μM DE BAP. F. ASPECTO DE TUFO COM BROTAÇÕES ALONGADAS, AOS 30 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO*, MANTIDO EM MEIO DE CULTURA MS LÍQUIDO COM 1,11 μM DE BAP. BARRA: 1 CM.

REFERÊNCIAS

- BRUM, G. R. **Micropropagação da figueira (*Ficus carica* L.) Roxo de Valinhos**. 2001. 41 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- CABEL, S. R. **Micropropagação de cinamomo (*Melia azedarach* L.)**. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. T. Z. do; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais**. São Paulo, n.48/49, p.107-116, jan./dez.1995
- COSTA, T. da; ZAFFARI, G. R. Micropropagação de *Ananas bracteatus* (Schultz) var. *striatus* Hort. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 11, p. 109-113, 2005.
- DIBAX, R. **Transformação genética de *Eucalyptus saligna* com o gene P5CSF129A via *Agrobacterium tumefaciens***. 112 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- DOMINGUES, E. T.; NETO, A. T.; MENDES, B. M. J. Cultura de ápices caulinares de *Musa* sp, var. maçã: estabelecimento, micropropagação e enraizamento *in vitro*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 387-394, 1995.
- EMBRAPA. Núcleo Tecnológico para Informática. SOC – **Software Científico**. Campinas, 1990.
- FANTINI JUNIOR, M.; GRAÇA, M. E. C. Propagação *in vitro* de *Eucalyptus saligna*. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, Campos do Jordão, 1990. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1990. p. 373-378.
- GAMBORG, O. L.; SHYLUK, J. P. Nutrition, media, and characteristics of plant cell and tissue cultures. In: THORPE, T. A. (Ed.). **Plant tissue culture: methods and applications in agriculture**. New York: Academic Press, 1981. p. 21-44.
- GEORGE, F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. England: Exegetics, v. 1, 1993. 574 p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.
- HARRY, I. S.; THORPE, T. A. *In vitro* culture of forest trees. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Eds.). **Plant Cell and Tissue Culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 539-560, 1994.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagator's Society. Proceedings**, Seattle, v. 30, p. 421-427, 1986.

LIST, S. E.; BROWN, P. H.; LOW, C, S.; WALSH, K. B. A micropropagation protocol for *Melaleuca alternifolia* (tea tree). **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 36, p. 755-760, 1996.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; GUERRA, M. P.; HOPPE, J. M. Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morototoni* (aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 47-61, 1999.

MNENEY, E. E.; MANTELL, S. H. Clonal propagation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) by tissue culture. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 6, n. 7, p. 649-657, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-479, 1962.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Columbus, v.25, p.135-166, 1974.

NUNES, E. C.; CASTILHO, C. V.; MORENO, F. N.; VIANA, A. M. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 70, n. 3, p. 259-268, 2002.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Heidelberg, v. 38, p. 116-124, 2002.

ROCHA, S. C.; QUOIRIN, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 43-50, 2007.

SCHOTTZ, E. S. **Micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla* King) a partir de material juvenil**. Curitiba, 2003. 56 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; AMUTHA, S.; SELVARAJ, N. *In vitro* propagation of *Acacia* species - a review. **Plant Science**, Limerich, v. 163, p. 663-671, 2002.

5. ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO DE *Melaleuca alternifolia*

RESUMO

O estudo de fatores como tipo de auxina, concentração de sacarose e composição do meio de cultura é importante durante a fase de enraizamento das brotações e pode refletir no comportamento das plantas após a transferência das mesmas para a casa-de-vegetação. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a influência de diferentes concentrações de ANA, AIA e AIB, sacarose e meios de cultura no enraizamento *in vitro* de *Melaleuca alternifolia*. Brotações mantidas em meio de multiplicação (MS líquido com 1,11 μM de BAP) foram utilizadas como explantes. Microestacas, destacadas de tufos em multiplicação, com aproximadamente 1 cm de comprimento, foram inoculadas em meio de cultura MS, onde foram variadas o tipo de auxina (ANA, AIA ou AIB) e as suas concentrações (0,53 e 2,64 μM). Foram testadas três concentrações de sacarose (15, 30 e 45 g L^{-1}). Estudou-se também o efeito da adição do carvão ativado nos meios MS e MS/2 sobre o enraizamento *in vitro*. Posteriormente, foi avaliada a influência do meio de cultura utilizado no enraizamento sobre a sobrevivência das plantas após 30 e 60 dias de aclimatização. Pode-se concluir que para o enraizamento de *M. alternifolia* é dispensável o suprimento de auxinas no meio de cultura, que a sacarose influencia de forma positiva o enraizamento, obtendo-se o maior percentual (100%) com 30 g L^{-1} , e que o meio de cultura MS permite maior taxa de enraizamento (100%) e sobrevivência após a aclimatização das mudas.

Palavras-chave: Auxinas. Carvão ativado. Micropropagação. Sacarose.

IN VITRO ROOTING AND ACCLIMATIZATION OF *Melaleuca alternifolia***ABSTRACT**

Studying some factors like type of auxins, sucrose concentration and culture medium composition are important for *in vitro* rooting and may affect the survival percentage in a greenhouse. Therefore, the third aim of this work was to evaluate the influence of different concentrations of NAA, IAA and IBA, sucrose and culture media on the *in vitro* rooting of *Melaleuca alternifolia*. Shoots of *M. alternifolia* propagated on liquid MS with 1,11 μM BAP were used as explant source. The microcuttings, detached of shoot clumps, with approximately 1 cm of length, were cultured in MS medium supplemented with 3 types (NAA, IAA or IBA) and concentrations (0.53 and 2.64 μM) of auxin and 3 concentrations of sucrose (15, 30 and 45 g L^{-1}). The addition of activated charcoal into MS and MS/2 medium was also studied during *in vitro* rooting. The influence of the rooting medium on survival of plants in the greenhouse was evaluated after 30 and 60 days. In conclusion, rooting of *M. alternifolia* does not need auxin. However, 30 g L^{-1} sucrose added into the MS medium allows higher rooting rate (100%) and *ex vitro* survival during acclimatization.

Key-words: Activated charcoal. Auxins. Micropropagation. Sucrose.

5.1 INTRODUÇÃO

O estudo dos fatores que interferem no enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas é decisivo para que a técnica de micropropagação torne-se economicamente viável. A manipulação correta destas últimas fases é decisiva para que se alcance um bom índice de sobrevivência ao final de todo o processo.

O estudo de fatores como tipo de auxina, concentração de sacarose e composição do meio de cultura são importantes durante a fase de enraizamento das brotações e podem refletir no comportamento das plantas após a transferência das mesmas para a casa-de-vegetação.

Embora existam espécies que formam raízes adventícias apenas com os níveis endógenos de auxina, geralmente é necessário adicionar auxina exógena para estimular a rizogênese (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). Estes reguladores podem ser utilizados isoladamente ou em combinação, no meio de enraizamento, sendo que o ácido indolacético (AIA), ácido indolilbutírico (AIB) e ácido α -naftalenoacético (ANA) são os mais empregados. As concentrações mais freqüentes estão na faixa de 0,5 a 5,0 μ M (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Além disto, os tratamentos *in vitro* também podem refletir na capacidade das plantas suportarem as mudanças bruscas de ambiente que a passagem para a casa-de-vegetação ocasiona. Dentre estes, a necessidade de sacarose no período final do cultivo é bastante discutida por vários autores. Conforme Kozai (1991), na presença de açúcar, as plantas não desenvolvem capacidade fotoautótrofica, podendo levar a um crescimento reduzido e conseqüente morte das mudas durante a fase de aclimatização.

Diluições do meio MS, bem como o uso de carvão ativado no meio de cultura, são práticas que vem sendo utilizadas em várias espécies durante o enraizamento *in vitro*. Em muitos casos, a resposta quanto ao enraizamento não difere em relação aos tratamentos que utilizam auxinas, como observado por Dibax (2007) em *Eucalyptus saligna*.

Diante da importância em se estabelecer um protocolo de enraizamento e aclimatização que permita a obtenção de altos níveis de sobrevivência, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a influência de diferentes concentrações de ANA, AIA e AIB, sacarose e meios de cultura no enraizamento *in vitro* de *Melaleuca alternifolia*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-Paraná.

A aclimatização das mudas enraizadas deu-se em casa-de-vegetação climatizada (*PAD & FAN*), coberta com plástico de polietileno anti-UV, situada no mesmo Setor.

5.2.1 Material vegetal

Brotações de *M. alternifolia*, mantidas em meio de multiplicação (MS líquido com 1,11 μM de BAP) foram utilizadas como explantes. Esses foram constituídos de microestacas destacadas dos tufos com aproximadamente 1 cm de comprimento e inoculados em frascos de cultivo contendo 30 mL de meio de cultura, conforme os experimentos.

5.2.2 Condições de cultura

5.2.2.1 *In vitro*

As culturas foram realizadas em frascos de vidro de 6 cm de diâmetro e 9 cm de altura, vedados com tampa de polipropileno rígido, mantidos em sala climatizada por 30 dias, equipada com lâmpadas fluorescentes do tipo “luz do dia”, irradiância de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

5.2.2.2 *Ex vitro*

Após o cultivo *in vitro*, as plantas que apresentaram raízes foram transferidas para casa-de-vegetação, aclimatizadas em tubetes de polipropileno (capacidade de 53 cm³) com substrato Plantmax HT[®] e mantidas sob nebulização intermitente (das 8:00 às 17:00 h irrigação de 15 s a cada 15 min; das 17:00 às 23:00 h irrigação de 15 s a cada 1 hora e das 23:00 às 8:00 h irrigação de 15 s a cada 3 h) por 30 dias, sendo então transferidas para bancada e irrigadas manualmente conforme a necessidade.

5.2.3 Variáveis analisadas

Em todos os experimentos, após 30 dias da inoculação nos diferentes meios de cultura, foram analisadas em laboratório as variáveis porcentagem de explantes enraizados, número médio de raízes por explante, comprimento médio de raízes, altura da parte aérea (cm) e massa fresca total (g).

Aos 30 e 60 dias da transferência para o substrato, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plantas.

5.2.4 Efeito do ANA, AIA e AIB no enraizamento *in vitro* de *M. alternifolia*

Microestacas de *M. alternifolia* com aproximadamente 1 cm de comprimento foram inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) semi-sólido (6 gL⁻¹), suplementado com vitaminas e compostos orgânicos do meio MS e 30 g L⁻¹ de sacarose, onde foram variados o tipo de auxina (ANA, AIA ou AIB) e as suas concentrações (0,53 e 2,64 µM).

Todos os reguladores vegetais foram adicionados ao meio de cultura antes da esterilização do mesmo, que ocorreu em autoclave a 1 atm e 121 °C, durante 20 minutos.

5.2.5 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, num arranjo bifatorial 3x3, considerando duas concentrações (0,53 e 2,64 μM) e um controle sem auxina, e três tipos de auxinas (ANA, AIA e AIB). Cada tratamento foi constituído de cinco repetições de cinco explantes cada, sendo os resultados apresentados, a média de três experimentos.

Os dados oriundos de porcentagem foram transformados para $\arcseno\sqrt{x/100}$ e os de contagem para $\sqrt{x+1}$, submetidos à análise de variância e ao teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Para o processamento dos dados, utilizou-se o programa computacional SOC (Embrapa, 1990).

5.2.6 Efeito de diferentes concentrações de sacarose no enraizamento *in vitro* de *M. alternifolia*

Microestacas de *M. alternifolia* com aproximadamente 1 cm de comprimento foram inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) semi-sólido, suplementado com 6 g L⁻¹ de ágar (Vetec[®]) com diferentes concentrações de sacarose (15, 30 e 45 g L⁻¹).

5.2.7 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo que os tratamentos foram constituídos por três concentrações de sacarose (15; 30; e 45 g L⁻¹). Cada tratamento apresentou cinco repetições de cinco explantes cada, sendo os resultados apresentados, a média de três experimentos.

Os dados oriundos de porcentagem foram transformados para $\arcseno\sqrt{x/100}$ e os de contagem para $\sqrt{x+1}$, submetidos à análise de variância e ao teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se para o processamento dos dados, o programa computacional SOC (Embrapa, 1990).

5.2.8 Efeito de diferentes meios de cultura no enraizamento *in vitro* de *M. alternifolia*

Microestacas de *M. alternifolia* com aproximadamente 1 cm de comprimento foram inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) semi-sólido (6 gL⁻¹ de ágar). Os tratamentos consistiram do meio de cultura MS com a concentração de sais normal ou reduzida à metade (MS/2), com ou sem carvão ativado (2 g L⁻¹).

5.2.9 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, onde cada tratamento apresentou cinco repetições de cinco explantes cada, sendo os resultados apresentados, a média de três experimentos.

Os dados oriundos de porcentagem foram transformados para arcoseno $\sqrt{x/100}$ e os de contagem para $\sqrt{x+1}$, submetidos à análise de variância e ao teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se para o processamento dos dados, o programa computacional SOC (Embrapa, 1990).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Efeito do ANA, AIA e AIB no enraizamento *in vitro* de *M. alternifolia*

De forma geral, a iniciação do enraizamento foi verificada após o 8º dia da inoculação das microestacas nos meios de enraizamento, sendo que no tratamento controle (sem adição de auxina), as raízes apresentavam-se mais finas, maleáveis, e em menor número (2,3) (FIGURA 5A).

Em relação às variáveis porcentagem de enraizamento e massa fresca total, verificou-se que a interação entre os fatores tipo de auxina e concentrações testadas não foi significativa (ANEXOS 15 e 16). Porém, houve diferença significativa entre as concentrações, onde a ausência de auxina e a menor concentração testada (0,53

μM) possibilitaram maior porcentagem de enraizamento em relação à concentração de 2,64 μM . Já a maior concentração proporcionou, por outro lado, incremento em massa fresca significativo (TABELA 7), provavelmente pelo fato dessa condição ter favorecido a variável número médio de raízes.

TABELA 7 - PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO E MASSA FRESCA DE MICROESTACAS ENRAIZADAS EM MEIO DE CULTURA MS CONTENDO DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES DE AUXINA.

Auxinas (μM)	Enraizamento (%)	Massa fresca (g)
0,00	100 a	0,15 c
0,53	96,0 a	0,22 b
2,64	90,6 b	0,27 a
CV(%)	13,63	11,29

* Médias seguidas com letras idênticas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

De forma semelhante, em amoreira-preta cv Brazos, Augusto (2001) verificou que na ausência de auxina no meio de cultura, o enraizamento foi de 100%. Entretanto, em muitos casos as auxinas aumentam o percentual de enraizamento *in vitro*, como foi verificado por Randmann (2002) no porta-enxerto de macieira M-9.

Já Dibax (2007) não encontrou diferenças significativas entre os resultados quando utilizou a auxina ANA (0; 1,35; 2,70 e 5,4 μM) durante o enraizamento de *E. saligna*. As porcentagens de microestacas enraizadas variaram entre 59,75 e 76,25%, sendo que o controle, constituído pelo meio MS/2 sem ANA, apresentou 73,75%. Valores semelhantes foram encontrados no enraizamento de microestacas de *E. botryoides*, *E. camaldulensis*, *E. deglupta* e *E. grandis* por Ito et al. (1996), quando foram utilizadas concentrações inferiores às testadas por Dibax (2007), sugerindo que para estes casos, as concentrações endógenas de auxinas são suficientes para a promoção do enraizamento, como o verificado em *M. alternifolia*.

As variáveis número médio de raízes, comprimento médio e altura da parte aérea, por outro lado, apresentaram interação significativa entre os tipos e as concentrações de auxina utilizadas (ANEXOS 17 à 19).

Na variável número de raízes, analisando o efeito das concentrações em cada tipo de auxina testadas, a concentração de 2,64 μM foi superior estatisticamente a 0,53 μM nos três tipos de auxinas. Analisando o efeito do tipo da auxina nas concentrações testadas, na concentração de 0,53 μM o ANA mostrou-se superior em relação ao AIA e AIB para esta variável. Contrariamente, na concentração de 2,64 μM o ANA mostrou-se inferior as outras duas auxinas (TABELA 8).

TABELA 8 – NÚMERO E COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES E ALTURA DA PARTE AÉREA DE MICROESTACAS ENRAIZADAS EM MEIO MS CONTENDO DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES DE AUXINA.

Número de raízes			
Auxinas			
Concentração (μM)	ANA	AIA	AIB
0,00	2,3 cA	2,3 cA	2,3 cA
0,53	7,5 bA	4,9 bB	4,5 bC
2,64	8,0 aB	10,1aA	10,2 aA
CV(%)	6,93		

Comprimento das raízes (cm)			
Auxinas			
Concentração (μM)	ANA	AIA	AIB
0,00	1,7 bA	1,7 bA	1,7 bA
0,53	2,1 aB	2,6 aA	2,4 aA
2,64	1,3 cB	1,7 bA	1,6 bA
CV(%)	7,67		

Altura da PA (cm)			
Auxinas			
Concentração (μM)	ANA	AIA	AIB
0,00	2,3 aB	2,3 bA	2,3 cA
0,53	3,1 aB	3,6 aA	3,3 bAB
2,64	2,7 bB	3,5 aA	3,7 aA
CV(%)	10,38		

Médias seguidas por letras minúsculas idênticas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

No presente experimento, pôde-se perceber também que a ausência da auxina, embora tenha favorecido o enraizamento, proporcionou menor produção de raízes por explante. Diferentemente, Radmann et al. (2003) ao estudarem a influência do AIB (0,5 e 10 μM) no enraizamento de amoreira-preta em meio MS, verificaram que o maior número de raízes por explante (5,5) ocorreu no tratamento sem auxina.

Observou-se que as raízes formadas em meio de cultura contendo auxina apresentavam-se mais grossas que as formadas na ausência do regulador vegetal, sendo naquela situação também observada a formação de calos na base das raízes. Alguns autores ressaltam que a formação de raízes grossas e/ou calos é indesejável durante esta etapa, visto que podem interferir na funcionabilidade do sistema radicial, comprometendo assim a aclimatização das plantas e o completo desenvolvimento dos protocolos de micropropagação (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; COMPTON et al., 2001).

Com relação ao comprimento das raízes, verificando o efeito das concentrações em cada tipo de auxina, a concentração de 0,53 foi superior estatisticamente em todos os três tipos para esta variável. Já analisando o efeito do tipo do regulador vegetal em cada concentração, tem-se que na concentração de 0,53 μM , AIA e AIB foram superiores ao ANA e na concentração de 2,64 μM ocorreu o mesmo efeito (TABELA 8). Já Melo et al. (2001) verificou que o ANA foi superior ao AIB quanto ao comprimento das raízes (5,6 e 0,79 cm, respectivamente) de guarirrobeira, mostrando que o efeito da auxina é muito variável entre as espécies.

Com relação à altura da parte aérea, analisando o efeito das concentrações dentro de cada tipo de auxina testada, para o ANA a melhor concentração foi 0,53 μM , para o AIA as duas concentrações tiveram o mesmo efeito e para AIB 2,64 μM foi superior. Verificando o efeito do tipo de auxina em cada concentração, em 0,53 μM o AIA foi superior ao ANA não diferindo da testemunha, e em 2,64 μM , AIA e AIB tiveram o mesmo comportamento, sendo superiores ao ANA (TABELA 8). O maior valor encontrado para esta variável foi com a utilização de 2,64 μM de AIB (3,7 cm). De forma geral produziu-se plantas entre 2,3 e 3,7 cm de comprimento.

A suplementação de auxinas ao meio de enraizamento é usual, entretanto, há espécies que enraízam com facilidade e não necessitam da presença destes reguladores, o que pode ser explicado pelo elevado nível endógeno desses reguladores vegetais (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; PINTO e LAMEIRA, 2001).

List et al. (1996) ao testarem duas concentrações de AIA (0,1 e 1,0 μM) no enraizamento de *M. alternifolia* em meio MS semi-sólido, encontraram valores crescentes para ambas as concentrações quanto ao incremento no número de raízes no decorrer de 8 semanas, relatando a ocorrência de 80% de enraizamento ao final deste período, em ambas as concentrações.

Já no presente trabalho, a ausência de auxina possibilitou resultados satisfatórios em relação ao enraizamento *in vitro* em todas as variáveis analisadas, sendo superiores aos encontrados por List et al. (1996) Esta condição permitiu a maior porcentagem de enraizamento (100%), demonstrando que a espécie provavelmente possui níveis endógenos de auxina satisfatórios e suficientes para que ocorra o enraizamento.

5.3.2 Efeito de diferentes concentrações de sacarose no enraizamento *in vitro* de *Melaleuca alternifolia*

A análise de variância mostrou que houve significância para todas as variáveis analisadas, sendo que houve uma tendência de aumento nas variáveis à medida que ocorria o acréscimo na concentração de sacarose, até 30 g L⁻¹ (ANEXOS 20 a 24 e FIGURA 4).

A iniciação radicial visualmente aconteceu a partir do 12º dia da inoculação em praticamente todos os tratamentos, exceto no tratamento testemunha, com ausência de sacarose, sugerindo que a presença de carboidrato influencia na velocidade de enraizamento de *M. alternifolia*. Este fato vai ao encontro da afirmativa que além dos nutrientes, os carboidratos também têm efeito sobre a formação de raízes adventícias (ASSIS e TEIXEIRA, 1998; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; PASQUAL, 2001; ALOUFA, 2003).

Analisando a porcentagem de enraizamento, verificou-se um efeito quadrático positivo, onde a máxima eficiência estimada é de 30,8 g L⁻¹. Segundo George (1996), para a formação de raízes *in vitro* há necessidade de energia e carboidratos, sendo estes fornecidos pela fotossíntese (em condições autotróficas) ou oriundos de uma fonte exógena de açúcar (em sistema heterotrófico ou mixotrófico).

Na ausência de sacarose ocorreu enraizamento, em taxa baixa, sugerindo que as reservas de carboidratos contidas nos tecidos, devido ao cultivo em meio anterior contendo sacarose, possivelmente foram utilizadas como fonte de energia para promover a formação de raízes.

A concentração de sacarose não deve ser superior a 30 g L⁻¹, pois acima desta concentração existe uma tendência de redução em todas as variáveis analisadas (FIGURA 4).

Em marmeleiro, Erig et al. (2004) verificaram que a ausência de sacarose ocasionou as menores porcentagens de enraizamento. Resultados semelhantes foram obtidos por Lane (1978), onde concentrações de sacarose inferiores a 20 g.L⁻¹ e superiores a 50 g.L⁻¹ no meio de cultura, prejudicaram o enraizamento de macieira. Da mesma forma, De Paoli et al. (2002) também observaram que brotos de *Cydomalus* (*Malus communis* x *Cydonia oblonga*) enraizaram com dificuldade em meio de cultura sem sacarose.

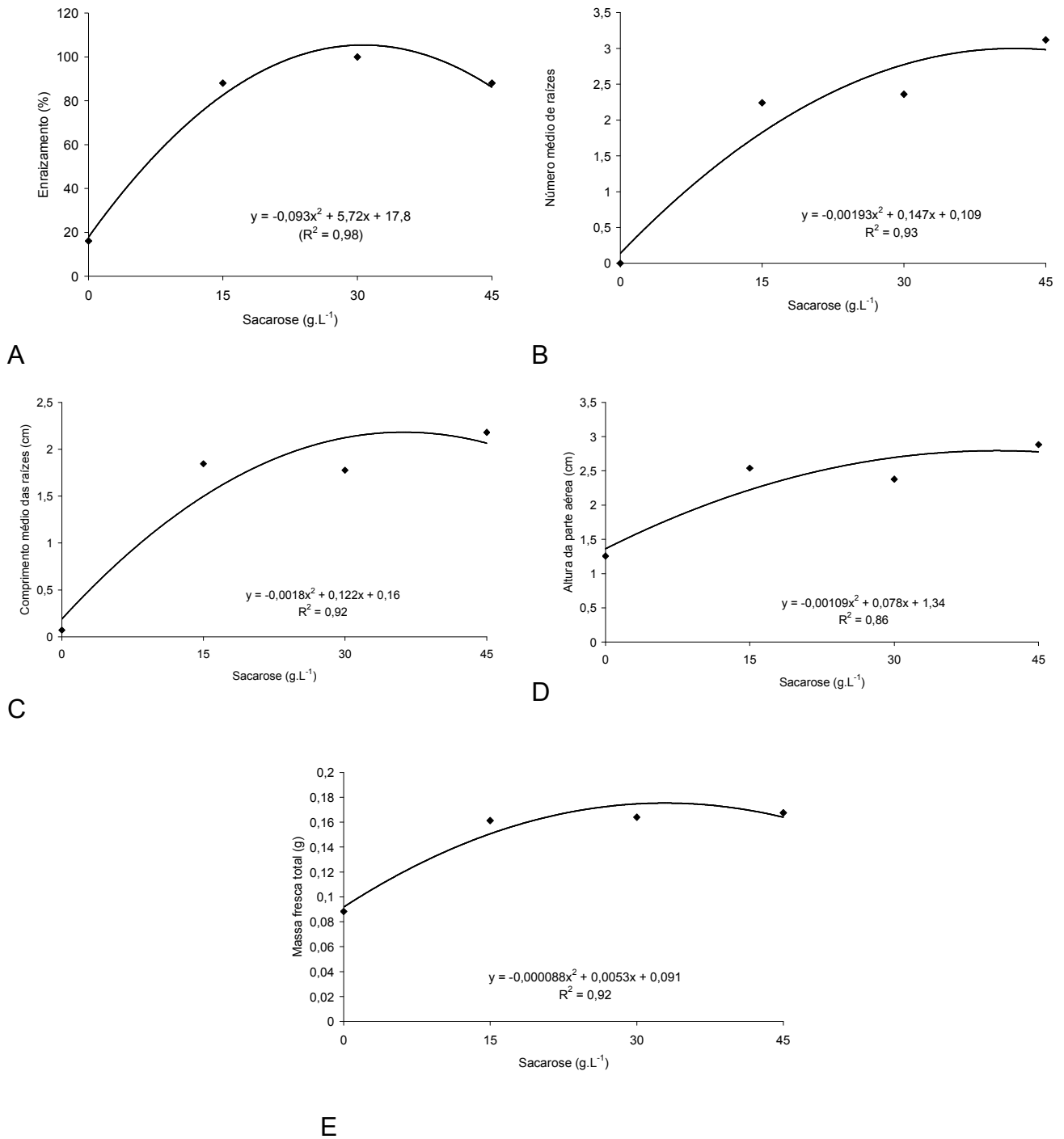


FIGURA 4 - EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NA PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO DE *M. alternifolia* (A); NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES (B); COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES (C); ALTURA DA PARTE AÉREA (D) E MASSA FRESCA TOTAL (E).

Nos estudos realizados por Leite et al. (2000) com porta-enxerto de pereira, maior porcentagem de enraizamento foi obtida com 20 g L⁻¹ de sacarose. Isutsa (2004) não obteve diferença quanto à porcentagem de enraizamento *in vitro* de

Passiflora edulis, quando utilizou 20 ou 30 g L⁻¹ de sacarose, já que em ambas concentrações houve 100% de enraizamento.

Estes resultados mostram que existe variação na resposta rizogênica entre as espécies em relação à concentração de carboidratos existente no meio de cultura. No entanto, a relação exata entre auxinas, carboidratos e enraizamento é bastante complexa e o seu completo entendimento ainda é desconhecido e exige estudos mais elaborados (VEIERSKOV, 1988; ALOUFA, 2003).

As médias relativas às variáveis número, comprimento, altura da parte aérea e massa fresca foram superiores à medida que se aumentou o suprimento de sacarose no meio de cultura. É evidente a diferença no comprimento da parte aérea das plantas mantidas em meio de cultura com a suplementação de carboidrato (FIGURA 5B).

Observou-se a ocorrência de coloração escura (FIGURA 5B) nos explantes mantidos em meio de cultura contendo maior concentração de sacarose, uma maior sensibilidade a desidratação, além da produção de folhas mais estreitas. Provavelmente a alta concentração de sacarose interferiu em algum processo relativo à produção de clorofila em *Melaleuca*. Entretanto, para confirmar tal hipótese, se faz necessário a realização de testes relativos à quantificação dos teores de clorofilas nas folhas submetidas ao cultivo em meio de cultura com distintas concentrações de sacarose.

De uma maneira geral, os explantes que foram cultivados na ausência de sacarose não se desenvolveram em altura e não formaram raízes, sendo que as plantas dos demais tratamentos apresentaram coloração semelhante. A sacarose influenciou de forma positiva o enraizamento de *M. alternifolia*, mostrando-se necessária nessa fase do cultivo *in vitro*. O observado concorda com vários autores que mencionam como sendo indispensável o fornecimento de sacarose no processo de enraizamento *in vitro* (BOSA et al., 2003; CALVETE et al., 2002; LEITE et al., 2000; SEON et al., 1999).

Já Santana et al. (2008) indicam que a presença de sacarose no meio foi dispensável na fase de enraizamento de *Annona glabra*, relatando que o estímulo do comportamento fotoautotrófico foi obtido com sucesso durante a fase de enraizamento *in vitro* da espécie. Entretanto, esse comportamento foi verificado pelos autores nos explantes mantidos em tubos de ensaio vedados com algodão e

com tampa plástica sem película de PVC, que ocasionou assim maior aeração dentro do recipiente de cultivo.

Nesse sentido, Kozai et al. (2004), afirmam que a baixa concentração de CO₂ nos frascos durante a maior parte do fotoperíodo é devida em parte ao baixo índice de ventilação dos frascos hermeticamente fechados e a uma quantidade de CO₂ limitada nos pequenos frascos de cultivo. A baixa concentração de CO₂ inibe a atividade fotossintética nas plantas *in vitro* forçando as plantas a desenvolverem um crescimento heterotrófico ou fotomixotrófico pela absorção de sacarose do meio de cultura como sua principal fonte de carbono. Já Capellades et al. (1991) e Hdider e Desjardins (1994) sugerem ainda que *in vitro* não há atividade fotossintética em presença de altas concentrações de sacarose, devido ao acúmulo de amido ou à inibição da enzima Rubisco. Reduções nas taxas fotossintéticas em decorrência do acúmulo de amido nas folhas de cafeeiro foram demonstradas por Da Matta et al. (1997).

Em mamoeiro, Schmildt et al. (2007), perceberam que na ausência de sacarose as folhas apresentaram-se aclorofiladas. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), adições de sacarose no meio de cultivo em concentrações menores de 20 g L⁻¹ podem causar clorose generalizada da cultura, o que não foi observado em *M. alternifolia*. Em contraposição, a adição de sacarose no meio de cultivo em concentrações acima de 40 g L⁻¹ podem causar um excessivo decréscimo do potencial hídrico do meio, podendo ocasionar desidratação dos tecidos e levar à deterioração das culturas.

No presente trabalho o número de raízes foi favorecido pela presença de sacarose, havendo uma tendência de estabilização na maior concentração (45 g L⁻¹). Já Schmildt et al. (2007) relataram que em mamoeiro, o número médio de raízes formadas nos segmentos nodais foi muito próximo nos níveis 15, 30 e 0 g L⁻¹ de sacarose, com valores de 3,35; 2,87 e de 2,75 raízes por ramo, respectivamente. As concentrações de sacarose de 45 e 60 g L⁻¹ promoveram menores emissões de raízes formando, respectivamente, 1,80 e 2,01 raízes por microestaca.

Em *Melaleuca*, o enraizamento, o comprimento médio e a massa fresca total também foram crescentes, respondendo de forma positiva até a maior concentração testada. Pelos gráficos percebe-se que há uma tendência de decréscimo destas variáveis em concentrações superiores a esta, apresentando provavelmente nestes casos, um efeito inibitório ao enraizamento (FIGURA 4).

Entretanto, segundo Souza e Pereira (2007), os carboidratos em si não aumentam a resposta ao enraizamento, e sim são fontes de energia e de carbono para a síntese de substâncias essenciais para a formação de raízes. Nessa mesma perspectiva, Assis e Teixeira (1998) comentam que, durante a etapa de enraizamento, quantidades ótimas de carboidratos devem ser consideradas, visto que a sua influência sobre a formação das raízes *in vitro*, está relacionada ao requerimento de energia durante o processo de iniciação radicular. Além disto, no meio de cultura também exercem a função de agente osmótico.

5.3.3 Efeito de diferentes meios de cultura no enraizamento *in vitro* de *Melaleuca alternifolia*

Por meio da análise de variância (Anexos 25 a 29), constatou-se que houve diferenças estatísticas entre os resultados obtidos nos meios de cultura testados para todas as variáveis analisadas. Verificou-se que o meio MS apresentou porcentagem de enraizamento de 100%, superior aos demais meios (TABELA 9).

TABELA 9 – EFEITO DE DIFERENTES VARIAÇÕES DO MEIO MS NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE *Melaleuca alternifolia*.

Meio	Enraizamento (%)	Nº médio raízes	Comprimento médio raízes (cm)	Altura parte aérea (cm)	Massa fresca total (g)
MS/2	64 b	2,72 a	3,34 a	2,06 c	0,137 c
MS	100 a	3,00 a	2,20 c	3,27 a	0,189 a
MS/2+CA	28 c	1,36 b	3,32 a	2,60 b	0,148 c
MS+CA	36 c	1,18 b	2,78 b	3,42 a	0,165 b
Média Geral	57	2,06	2,91	2,83	0,160
CV(%)	15,0	9,0	7,7	10,9	5,3

Médias seguidas com letras idênticas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A influência da composição dos meios de cultura no processo de enraizamento adventício *in vitro*, está relacionada à concentração de sais minerais empregados no preparo do mesmo e na presença de reguladores vegetais. De modo geral, o uso de meios menos concentrados tem permitido melhores resultados no enraizamento de plantas *in vitro* (McCOWN, 1988; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; PINTO e LAMEIRA, 2001; PASQUAL, 2001; ALOUFA, 2003; SOUZA et al., 2004; LIMA, 2004). A alta concentração de sais, que compõem o meio

básico MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), mesmo em presença de auxinas, pode inibir o enraizamento *in vitro* (McCOWN, 1988). Diluições para $\frac{1}{2}$, e até $\frac{1}{4}$ de sais, têm possibilitado melhores resultados para muitas espécies de plantas. No presente trabalho, a redução da concentração de sais do meio MS prejudicou o enraizamento da espécie, cujo valor foi estatisticamente inferior (64%) ao mesmo meio completo (100%) (TABELA 9).

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), os efeitos benéficos da adição do carvão ativado ao meio de cultura estão relacionados a aspectos físicos, já que o carvão ativado simula uma condição de escuro, situação mais favorável ao desenvolvimento de raízes adventícias, além de adsorver substâncias prejudiciais ao enraizamento, como os compostos fenólicos.

Estudos de multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Acacia mearnsii* realizados em meio MS suplementado com carvão ativado, mostraram a eficiência desse elemento no enraizamento, no desenvolvimento normal da parte aérea e na prevenção de clorose nas folhas (QUOIRIN et al., 2001). Efeito positivo no enraizamento de *Ensete ventricosum* e *Argania spinosa* foi também relatado por Negash et al. (2000) e Bousselmane et al. (2001), respectivamente.

Contudo, a presença do carvão ativado não foi benéfica ao enraizamento de *Melaleuca*, diminuindo consideravelmente as porcentagens de enraizamento quando adicionado ao meio MS completo e MS/2, onde as porcentagens foram as mais baixas encontradas, 36 e 28% respectivamente. Segundo a literatura, esta substância pode também adsorver auxinas e nutrientes do meio de cultura, necessários ao enraizamento e desenvolvimento normal da parte aérea (McCOWN, 1988; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; PASQUAL, 2001; PINTO e LAMEIRA, 2001; ALOUFA, 2003). Possivelmente, a concentração utilizada de carvão ativado não foi adequada, fazendo-se necessário o estudo de menores concentrações, já que Grattapaglia e Machado (1998) mencionam que as concentrações de carvão adicionadas ao meio de enraizamento podem variar de 0,1 a 2%, e no presente estudo, foi utilizada a concentração máxima limite.

Resultados negativos quanto ao enraizamento em meio contendo carvão ativado foram obtidos também para a espécie *Ananas porteanus*, conhecida como abacaxi ornamental. Os resultados mostraram que ocorreu uma redução no tempo de indução, número de raízes e porcentagem de enraizamento (BORGES et al., 2001).

O carvão ativado também reduziu significativamente o número de raízes emitidas por explante, em relação aos mesmos meios sem a sua suplementação, provavelmente pelo fato de ter adsorvido nutrientes essenciais ao enraizamento. Contudo, aparentemente as plantas enraizadas nos tratamentos testados no presente experimento apresentavam alto vigor (FIGURA 5C).

5.3.4 Efeito dos meios de cultura utilizados no enraizamento sobre a sobrevivência das plantas

Analisando a sobrevivência das plantas advindas dos meios de cultura estudados neste trabalho, tem-se que o meio MS adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose proporcionou ao final de 30 e 60 dias da transferência para casa-de-vegetação, uma taxa de 100% de sobrevivência, tornando o protocolo economicamente viável. Esse valor foi superior estatisticamente aos dos demais meios (TABELA 11).

TABELA 10 – SOBREVIVÊNCIA DAS PLANTAS DE *M. alternifolia*, ENRAIZADAS EM MEIOS DE CULTURA CONTENDO DIFERENTES TIPOS DE CONCENTRAÇÕES DE AUXINA, AOS 30 E 60 DIAS DA ACLIMATIZAÇÃO.

Data	Tratamentos	30 dias	60 dias
05/02/08	MS	80 a	74 a
	MS + 0,53 µM AIA	28 c	24 cd
	MS + 2,64 µM AIA	16 d	16 d
	MS + 0,53 µM ANA	28 c	28 c
	MS + 2,64 µM ANA	20 cd	20 cd
	MS + 0,53 µM AIB	44 b	40 b
	MS + 2,64 µM AIB	28 c	22 cd
CV(%)		20,94	20,69

Médias seguidas com letras idênticas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

TABELA 11 - SOBREVIVÊNCIA DAS PLANTAS DE *M. alternifolia*, ENRAIZADAS EM MEIO DE CULTURA MS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE, AOS 30 E 60 DIAS DA ACLIMATIZAÇÃO.

Data	Tratamentos	30 dias	60 dias
07/02/08	MS (0 g L ⁻¹ sacarose)	44 c	44 c
	MS (15 g L ⁻¹ sacarose)	80 b	76 b
	MS (30 g L ⁻¹ sacarose)	100 a	100 a
	MS (45 g L ⁻¹ sacarose)	49 c	36 d
CV(%)		6,31	9,42

Médias seguidas com letras idênticas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

TABELA 12 – SOBREVIVÊNCIA DAS PLANTAS DE *M. alternifolia*, ENRAIZADAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA, AOS 30 E 60 DIAS DA ACLIMATIZAÇÃO.

Data	Tratamentos	30 dias	60 dias
10/02/08	MS	94 a	94 a
	MS/2	88 a	80 b
	MS + 0,2 % CA	68 b	64 c
	MS/2 + 0,2 % CA	64 b	60 c
CV(%)		14,2	12,28

Médias seguidas com letras idênticas na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Na aclimatização, as plantas que foram enraizadas em meio contendo auxinas tiveram as menores taxas de sobrevivência (TABELA 10). Possivelmente as raízes que foram produzidas *in vitro* sob estas condições não eram funcionais. Além disto, para Bhojwani e Razdan (1983), a diferenciação em tecidos vasculares é afetada pela presença de auxinas e sacarose e o efeito da auxina na diferenciação de tecidos vasculares está relacionado com a presença de sacarose. As raízes produzidas em meio de cultura contendo auxina, como já mencionado, apresentavam-se quebradiças, fato que foi observado em algumas plantas no momento da transferência.

Outro aspecto que pode ter influenciado a baixa taxa de sobrevivência destas plantas foi o tempo de permanência do explante em contato com a auxina (30 dias). A importância da relação entre concentração de auxina e tempo de permanência foi demonstrada no trabalho realizado por Radmann et al. (2002). Eles avaliaram a capacidade de enraizamento *in vitro* de diferentes porta-enxertos de macieira e concluíram que as estacas que permaneceram por 10 dias na presença de ANA, apresentaram maior porcentagem de enraizamento do que aquelas que permaneceram por períodos mais prolongados.

As plantas enraizadas na ausência de sacarose apresentaram uma sobrevivência de 44% ao final de 60 dias da aclimatização (TABELA 11), enquanto as enraizadas em meio contendo 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose, tiveram 76 e 100%, respectivamente. Isto comprova a importância da sacarose no acúmulo de energia que é utilizada durante este processo de aclimatização de *Melaleuca* até a emissão de novas raízes. Já na concentração de 45 g L⁻¹ de sacarose a taxa de sobrevivência das mudas decresceu para 36%, semelhante as enraizadas em meio sem a presença de sacarose, diferentemente do encontrado por Calvete (1998), que

ao enraizar mudas de morangueiro nesta mesma concentração, encontrou a melhor taxa de sobrevivência .

O meio MS/2 merece destaque por ter proporcionado a segunda maior taxa de sobrevivência das mudas (80%) após 60 dias de aclimatização (TABELA 12). Mesmo valor (80%) foi encontrado por Dibax (2007) ao aclimatizar mudas de *Eucalyptus saligna* enraizadas neste meio de cultura de mesma formulação ao utilizado no presente trabalho. Já quando o MS/2 foi suplementado com 2 g L⁻¹ de carvão ativado, proporcionou 64% de sobrevivência. Entretanto, Quisen (2007) ao utilizar este meio com a mesma concentração de carvão ativado no enraizamento de *Eucalyptus camaldulensis*, encontrou ao final de 20 dias da aclimatização uma taxa de 87% de sobrevivência.

As plantas enraizadas em meio MS nos três experimentos realizados apresentaram as maiores taxas de sobrevivência (74%, 100% e 94%) quando comparadas com os demais tratamentos dentro de cada experimento. Essa diferença pode estar relacionada às condições climáticas nos dias que ocorreram os transplantes.

No presente trabalho, tanto em termos de enraizamento como de aclimatização, o meio de cultura MS completo possibilitou maior porcentagem de enraizamento, possibilitando condições para *M. alternifolia* alcançar uma ótima taxa de aclimatização. As mudas apresentaram desenvolvimento satisfatório em casa-de-vegetação, após 60 dias de aclimatização (FIGURA 5D).

5.4 CONCLUSÕES

De acordo com as condições em que o presente trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

- Para o enraizamento de *M. alternifolia*, é dispensável o suprimento de auxinas no meio de cultura.
- A sacarose influencia de forma positiva o enraizamento e a aclimatização, obtendo-se o maior percentual em ambas as fases com 30 g L⁻¹, sendo necessária ao cultivo *in vitro* da espécie.
- O meio de cultura MS é o que permite maior taxa de enraizamento e sobrevivência após a aclimatização das mudas.

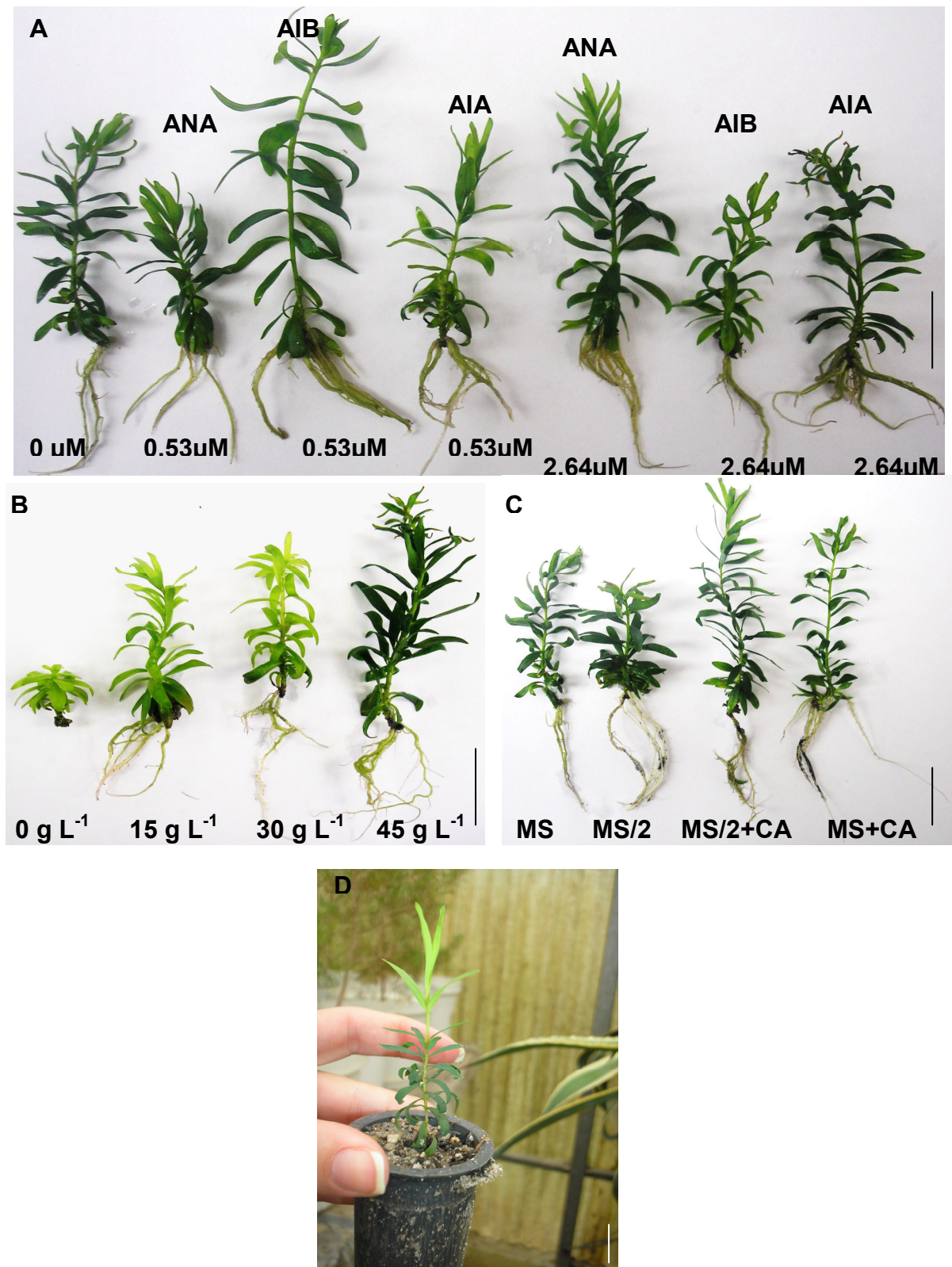


FIGURA 5- A. ASPECTO DAS PLANTAS ENRAIZADAS DE *M. alternifolia* EM DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES DE AUXINAS NO MEIO DE CULTURA MS. B. ASPECTO DAS PLANTAS ENRAIZADAS DE *M. alternifolia* EM MEIO DE CULTURA MS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE. C. ASPECTO DAS PLANTAS ENRAIZADAS DE *M. alternifolia* EM DIFERENTES VARIAÇÕES DO MEIO MS. D. ASPECTO DAS MUDAS DE *M. alternifolia* APÓS 30 DIAS DE ACLIMATIZAÇÃO. BARRA: 1 CM.

REFERÊNCIAS

- ALOUFA, M.A.I. Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, 2003. p. 3-5.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.261-96.
- AUGUSTO, C. S. S. **Micropropagação da amoreira-preta Cv. Brazos**. 132 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.
- BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant tissue culture: theory and practice**. New York: Elsevier, 1983. 501 p.
- BOUSSELMANE, F.; KANNY, L.; CHLYAH, H. Optimisation des conditions de culture pour l'enracinement *in vitro* de l'arganier (*Argania spinosa* L.). **Life Sciences**, Elmsford, v. 324, p. 995-1000, 2001.
- BORGES, N. S. S.; CORREIA, D.; LIMA, R. N. **Multiplicação e enraizamento *in vitro* de brotos de abacaxi ornamental *Ananas porteanus* Hort Veirch ex c. Koch**. Brasília: Embrapa, 2001. 5 p. (Recomendação técnica, 25).
- BOSA, N.; CALVETE, E. O.; SUZIN, M.; BORDIGNON, L. Avaliação do crescimento de *Gypsophila paniculata* durante o enraizamento *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 510-513, 2003.
- CALVETE, E.O. **Concentração de sacarose *in vitro* e seleção de substratos para aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv Campinas (*Fragaria ananassa* Duch.)**. 108 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
- CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 186-191, 2002.
- CAPELLADES, M.; LEMEUR, R.; DEBERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 21-26, 1991.
- COMPTON, M. E.; PIERSON, B. L.; STAUB, J. E. Micropropagation for recovery of *Cucumis hystrix*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 64, p. 53-67, 2001.

Da MATTA, F. M.; MAESTRI, M.; MOSQUIM, P. R.; BARROS, R. S. Photosynthesis in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) as affected by winter and summer conditions. **Plant Science**, v. 128, p. 43-50, 1997.

DIBAX, R. **Transformação genética de *Eucalyptus saligna* com o gene P5CSF129A via *Agrobacterium tumefaciens***. 112 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

DE PAOLI, G.; SUBIRÀ, E.; BATTISTINI, A. *In vitro* rooting of Pyrodwarf and Cydomalus, two rootstocks for pear, under photoautotrophic conditions. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 596, p. 463-467, 2002.

EMBRAPA. Núcleo Tecnológico para Informática. SOC – Software Científico. Campinas, 1990.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; CHAVES, A. C. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs. MC e Adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 5, n. 1-2, p. 61-68, 2004.

EBRAHIM, M. K. H.; IBRAHIM, I. A. Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation of *Maranta leuconeura* cv. Kerchoviana. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 86, p. 211-21, 2000.

FIDÉLIS, I.; CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; GAVILANES, M. L.; SANTIAGO, E. J. A. Características anatômicas de estruturas vegetativas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. desenvolvidas *in vitro* e *in vivo*. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 327-336, 2000.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 2: In Practice. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361p.

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

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

HDIDER, C.; DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 1, n. 36, p. 27-33, 1994.

ISUTSA, D. K. Rapid micropropagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) varieties. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, p. 395-400, 2004.

ITO, K.; DOI, K.; TATEMACHI, Y.; SHIBATA, M. Plant regeneration of *Eucalyptus* from rotating nodule cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 42-45, 1996.

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, T. H. **Micropropagation technology and application**. Dordrecht: Kluwer, 1991. 484 p.

KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system. **Springer**, Dordrecht The Netherlands, p. 119-142, 2004.

LANE, W. D. Regeneration of whole plants from shoot meristem tips. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 13, p. 281-285, 1978.

LIMA, E. C. **Indução e enraizamento *in vitro* de brotações em segmentos nodais de sangra d'água**. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

LEITE, G. B.; FINARDI, N.; FORTES, G. R. L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de pereira OH X F97. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 353-7, 2000.

LIST, S. E.; BROWN, P. H.; LOW, C. S.; WALSH, K. B. A micropropagation protocol for *Melaleuca alternifolia* (tea tree). **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, n. 36, p. 755-760, 1996.

McCOWN, B. H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v. 2, p. 289-302.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões de guarirobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, p. 1301-1306, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-479, 1962.

NEGASH, A.; PUITE, K.; SCHAART, J.; VISSER, B.; KRENS, F. *In vitro* regeneration and micropropagation of enset from Southwestern Ethiopia. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 62, p. 153-8, 2000.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 165p.

PINTO, J. E. B.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.

QUISEN, R. C. **Transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens***. 146 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

QUOIRIN, M.; DA SILVA, M. C.; MARTINS, K. G.; DE OLIVEIRA, D. E. Multiplication of juvenile black wattle by micro cuttings. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 66, p. 199-205, 2001.

RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxerto de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 624-628, 2002.

SANTANA, J. R. F. DE; PAIVA, R.; PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, L. M. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., I. Desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 80-86, 2008

SCHMILDT, E. R; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O. Sacarose na fase de enraizamento *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01'. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, p. 25-31, 2007.

SEON, J. H.; CUI, C. H.; PAEK, K. Y.; YANG, C. S.; GAO, W. Y.; PARK, C. H.; SUNG, S. N. Effects of air exchange, sucrose, and PPF on growth of *Rehmannia glutinosa* under enriched CO₂ concentration *in vitro*. **Acta Horticulture**, Amsterdam, v. 502, p. 313-318, 1999.

SOUZA, A. V.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; TEIXEIRA, R. N. Enraizamento *in vitro* de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.), uma planta medicinal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 7, n. 1, p. 86- 91, 2004.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 9, n.4, p.103-117, 2007.

VEIERSKOV, B. Relations between carbohydrates and adventitious root formation. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v. 2, p. 70-8.

6 CONCLUSÕES GERAIS

O estabelecimento *in vitro* de *Melaleuca alternifolia* é possível mediante o isolamento de segmentos nodais. A utilização de fungicida durante a assepsia e a inoculação em meio de cultura MS, permite maior produção de brotações por segmento nodal inoculado do que o meio WPM.

A multiplicação pode ser realizada em meio de cultura MS líquido, suplementado com 1,11 μM BAP que favorece maior produção de brotações múltiplas alongadas, não havendo necessidade de fase de alongamento.

Para o enraizamento e aclimatização, sugere-se o meio MS com 30 g L⁻¹ de sacarose, isento de reguladores vegetais e carvão ativado, para que ocorra sobrevivência satisfatória (100%) após a aclimatização das mudas em substrato Plantmax HT[®].

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A micropropagação de *M. alternifolia* utilizando o protocolo estabelecido no presente trabalho utilizando meio de cultura MS com 1,11 M BAP, permitiu produzir ao final de 60 dias, 11,8 brotos por nó, sendo superior ao protocolo elaborado por List et al. (1996) que ao final de 20 semanas, produziu 7 plantas por nó cultivado.

Contudo, testes envolvendo a aplicação de fungicida nas plantas matrizes em casa-de-vegetação, agitação dos frascos quando realizado cultivo em meio líquido e concentrações menores de carvão ativado durante as fases de estabelecimento *in vitro* e enraizamento, são sugeridas. Além disto, no cultivo inicial sugere-se o isolamento em meio de cultura suplementado com BAP.

Visando a produção comercial em larga escala, e tendo em vista o bom desempenho das brotações submetidas à multiplicação em meio de cultura líquido, sugere-se estudos envolvendo a utilização de biorreatores na micropropagação da espécie.

Para a fase de enraizamento, em virtude do nível endógeno de auxina na espécie, recomenda-se testes envolvendo o enraizamento *ex vitro*, o que diminuiria

assim o período de cultivo *in vitro* e uso de mão de obra, e conseqüentemente, o custo.

A análise do conteúdo de clorofila nas plantas submetidas ao cultivo em diferentes concentrações de sacarose durante o enraizamento seria interessante, bem como o estudo da influência do tipo de vedação do frasco de cultivo.

ANEXOS

ANEXO 1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MEIOS DE CULTURA MS E WPM:

Macronutrientes	MS		WPM	
	mgL ⁻¹	μM	mgL ⁻¹	μM
NH ₄ NO ₃	1650	20612,12	400	5000,00
KNO ₃	1900	18791,41	-	-
K ₂ SO ₄	-	-	990	5680,40
KH ₂ PO ₄	170	1249,17	170	1249,70
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	556	2354,40
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	2992,59	96	652,93
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	1501,01	370	1501,10
Micronutrientes				
Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	27,80	100,00	27,80	100,00
Na ₂ EDTA	37,30	100,20	37,30	100,20
H ₃ BO ₃	6,20	100,26	6,20	100,26
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30	100,00	22,30	100,00
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	29,91	8,60	29,91
KI	0,83	5,00	-	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	1,03	0,25	1,03
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,10	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,10	0,25	1,00
Substâncias orgânicas do meio MS mgL ⁻¹				
Tiamina.HCl	0,1			
Piridoxina.HCl	0,5			
Ácido Nicotínico	0,5			
Glicina	2			
Mio-inositol	100			
Sacarose	30000			

ANEXO 2 – COMPOSIÇÃO IÔNICA DOS MEIOS MS E WPM.

	MS	WPM
Macroelementos (mM)		
NH ₄ ⁺	20,61	5,00
NO ₃ ⁻	39,40	9,71
K ⁺	20,04	12,61
Ca ⁺²	2,99	3,01
Mg ⁺²	1,50	1,50
SO ₄ ⁼	1,73	7,41
PO ₄ ⁼	1,25	1,25
PO ₃ ⁼	0,1	0,1
Microelementos (µM)		
Mn ⁺²	100	2,1
Zn ⁺²	29,91	30
Na ⁺²	202,40	202,50
Fe ⁺²	100	100
Cl ⁻	6000	1306
Co ⁺²	0,105	-----
Cu ⁺²	0,100	0,100
MoO ₄ ⁼	1,03	1,03
B ⁺³	100	100
Total de íons (mM)	94,213	41,063
NH ₄ + NO ₃	60	14,58
NH ₄ /NO ₃	0,52	0,51

ANEXO 3 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Desinfestação	6	11581.04319924	1930.17386654	72.83 *
Resíduo	28	741.99512228	26.49982580	
Total	34	12323.03832152		

Média: 36.9

CV (%): 13,9

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

ANEXO 4 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Desinfestação	6	760.256156	126.709359	3.1498 *
Resíduo	28	1126.390309	40.22822535	
Total	34	1886.64646595		

Média: 35,8

CV (%): 17,6

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

ANEXO 5 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Sobrevivência	6	15733.61417	2622.269029	44.0243 *
Resíduo	28	1667.7951083	59.564111	
Total	34	17401.409282		

Média: 24,2

CV (%): 31,8

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

ANEXO 6 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE NO CULTIVO INICIAL.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tipo de meio	1	0,00132	0,00132	0,358 ns
Característica do meio	2	3,32792	1,66396	452,404*
Tipo x Variação	2	0,0072	0,0036	0,978 ns
Resíduo	24	0,08827	0,00368	
Total	29	3,42471		

Média: 1,4

CV (%): 4,2

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

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Consistência do meio	1	9.0525433	9.0525433	35.114*
BAP	5	21.491439	4.2982879	16.672*
Subcultivos	1	0.0034141	0.0034141	0.013 ns
Consist x BAP	5	8.85798703	1.771597	6.871*
Consist x Subcultivos	1	0.00008290	0.000082	0.0003 ns
BAP x Subcultivos	5	0.00414320	0.000828	0.0032 ns
Cons. x BAP x Subc.	5	0.00627889	0.001255	0.0049 ns
Resíduo	96	24.7492375	0.257804	
Total	119	64.1651270		

Média: 1.53

CV (%): 33,06

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

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

ANEXO 8 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL MASSA FRESCA NO CULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Consistência do meio	1	0.00011571	0.00011571	0.4878 ns
BAP	5	0.02292950	0.00458590	19.3326 *
Subcultivos	1	0.00011718	0.00011718	0.4940 ns
Consist x BAP	5	0.00754566	0.00150913	6.3620 *
Consist x Subcultivos	1	0.00005256	0.00005256	0.2216 ns
BAP x Subcultivos	5	0.00086829	0.00017366	0.7321 ns
Cons. x BAP x Subc	5	0.0002701	0.00005402	0.2277 ns
Resíduo	96	0.02277225	0.00023721	
Total	119	0.05467126		

Média: 0,029

CV (%): 51,74

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

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

ANEXO 9 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL MASSA SECA NO CULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Consistência do meio	1	0.00023964	0.00023964	37.52 *
BAP	5	0.00085540	0.00017108	26.79 *
Subcultivos	1	0.00000082	0.00000082	0.12 ns
Consist x BAP	5	0.00040186	0.00008037	12.58 *
Consist x Subcultivos	1	0.00000022	0.00000022	0.035 ns
BAP x Subcultivos	5	0.00000781	0.00000156	0.244 ns
Cons. x BAP x Subc.	5	0.00000035	0.00000007	0.010 ns
Resíduo	96	0.00061304	0.00000639	
Total	119	0.00211914		

Média: 0,004

CV (%): 58,9

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

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

ANEXO 10 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO NO CULTIVO EM MEIO DE CULTURA WPM.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Consistência do meio	1	44303.099556	44303.09955	133.565 *
BAP	5	2533.296913	506.659382	1.5275 ns
Subcultivos	1	8.69117563	8.69117563	0.0262 ns
Consist x BAP	5	14037.5295	2807.50590	8.4641 *
Consist x Subcultivos	1	31.5380490	31.5380490	0.0951 ns
BAP x Subcultivos	5	18.85229891	3.77045978	0.0114 ns
Cons. x BAP x Subc.	5	329.387627	65.87752551	0.1986 ns
Resíduo	96	31842.90119	331.6968874	
Total	119	93105.296318		

Média: 35,78

CV (%): 50,9

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

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

ANEXO 11 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE BROTO POR EXPLANTE NO CULTIVO EM MEIO DE CULTURA MS.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Consistência do meio	1	0.03993053	0.039930	0.1584 ns
BAP	5	47.85130977	9.5702619	37.9562 *
Subcultivos	1	0.00032674	0.00032674	0.0013 ns
Consist x BAP	5	17.02210491	3.40442098	13.5021 *
Consist x Subcultivos	1	0.00285764	0.00285764	0.0113 ns
BAP x Subcultivos	5	0.01027815	0.00205563	0.0082 ns
Cons. x BAP x Subc.	5	0.00410108	0.00082022	0.0033 ns
Resíduo	96	24.20541915	0.25213978	
Total	119	89.13632796		

Média: 1,89

CV (%): 26,48

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

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

ANEXO 12 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL MASSA FRESCA NO CULTIVO EM MEIO DE CULTURA MS.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Consistência do meio	1	0.24399642	0.24399642	41.059 *
BAP	5	0.65048602	0.13009720	21.892 *
Subcultivos	1	0.0006314	0.00063140	0.106 ns
Consist x BAP	5	0.57565950	0.11513190	19.374 *
Consist x Subcultivos	1	0.00021136	0.00021136	0.035 ns
BAP x Subcultivos	5	0.00160911	0.00032182	0.054 ns
Cons. x BAP x Subc.	5	0.00084390	0.00016878	0.028 ns
Resíduo	96	0.57047825	0.00594248	
Total	119	2.04391595		

Média: 0,146

CV (%): 52,67

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

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

ANEXO 13 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL MASSA SECA NO CULTIVO EM MEIO DE CULTURA MS.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Consistência do meio	1	0.09326247	0.09326247	58.010 *
BAP	5	0.12361455	0.02472291	15.378 *
Subcultivos	1	0.00047620	0.00047620	0.296 ns
Consist x BAP	5	0.11739931	0.02347986	14.604 *
Consist x Subcultivos	1	0.00000349	0.00000349	0.002 ns
BAP x Subcultivos	5	0.00039701	0.00007940	0.049 ns
Cons. x BAP x Subc.	5	0.00157400	0.00031480	0.195 ns
Resíduo	96	0.15433768	0.00160768	
Total	119	0.49106472		

Média: 0,052

CV (%): 76,32

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

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

ANEXO 14 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE OXIDAÇÃO NO CULTIVO EM MEIO DE CULTURA MS.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Consistência do meio	1	19637.377600	19637.377600	107.0344 *
BAP	5	38739.32559	7747.865118	42.2301 *
Subcultivos	1	37.211282	37.21128232	0.2028 ns
Consist x BAP	5	23066.5850	4613.31700	25.1451 *
Consist x Subcultivos	1	5.43167980	5.43167980	0.0296 ns
BAP x Subcultivos	5	26.88463097	5.37692619	0.0293 ns
Cons. x BAP x Subc.	5	27.08173865	5.41634773	0.0295 ns
Resíduo	96	17612.92495	183.4679682	
Total	119	99152.8225		

Média: 17,02

CV (%): 79,57

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

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

ANEXO 15 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO EM DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES DE AUXINAS.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Concentrações	2	988,56714	494,28357	3,7333*
Auxinas	2	7,13064	3,56532	0,02693 ns
Concentração x auxina	4	14,26128	3,56532	0,02693 ns
Resíduo	36	4766,34571	132,39849	
Total	44	5776,30477		

Média: 84,40

CV (%):13,63

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

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

ANEXO 16 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL MASSA FRESCA TOTAL EM DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES DE AUXINAS.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Concentrações	2	0,10882	0,05441	93,2781 *
Auxinas	2	0,00282	0,00141	2,42095 ns
Concentração x auxina	4	0,00456	0,00114	1,95524 ns
Resíduo	36	0,021	0,00058	
Total	44	0,1372		

Média: 0,2138

CV (%): 11,29

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

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

ANEXO 16 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES EM DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES DE AUXINAS.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Concentrações	2	15,82832	7,91416	278,305 *
Auxinas	2	0,03998	0,01999	0,7029 ns
Concentração x auxina	4	1,39304	0,34826	12,246 *
Resíduo	36	1,02373	0,02844	
Total	44	18,28508		

Média: 2,43

CV (%): 6,93

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

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

ANEXO 17 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES EM DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES DE AUXINAS.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Concentrações	2	5,43772	2,71886	125,679 *
Auxinas	2	0,74183	0,37092	17,145 *
Concentração x auxina	4	0,38468	0,09617	4,445 *
Resíduo	36	0,7788	0,02163	
Total	44	7,343		

Média: 1,91

CV (%): 7,67

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

ANEXO 18 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL ALTURA DA PARTE AÉREA EM DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES DE AUXINAS.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Concentrações	2	9,24162	4,62081	46,997 *
Auxinas	2	1,67842	0,83921	8,535 *
Concentração x auxina	4	1,87364	0,46841	4,764 *
Resíduo	36	3,5395	0,09832	
Total	44	16,3332		

Média: 3,02

CV (%): 10,38

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

ANEXO 20 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Sacarose	3	13514.94137589	4504.98045863	31.918 *
Resíduo	16	2258.24622143	141.14038884	
Total	19	15773.18759732		

Média: 64.8

CV (%): 18.3

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

ANEXO 21 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Sacarose	3	4.76165622	1.58721874	44.45 *
Resíduo	16	0.57132753	0.03570797	
Total	19	5.33298375		

Média: 1.47

CV (%): 12.83

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

ANEXO 22 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES (CM) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Sacarose	3	13.46000000	4.48666667	84.22*
Resíduo	16	0.85232000	0.05327000	
Total	19	14.31232000		

Media: 1.46

CV (%): 15.72

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

ANEXO 23 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA ALTURA DA PARTE AÉREA (CM) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Sacarose	3	7.45046000	2.48348667	51.8581*
Resíduo	16	0.76624000	0.04789000	
Total	19	8.21670000		

Média: 2.26

CV (%): 9.66

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

ANEXO 24 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL MASSA FRESCA TOTAL (G) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Sacarose	3	0.02069556	0.00689852	21.6712 *
Resíduo	16	0.00509323	0.00031833	
Total	19	0.02578879		

Média: 0.14

CV (%): 12.42

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

ANEXO 25 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Meios de cultura	3	10541.99577848	3513.99859283	55.5073 *
Resíduo	16	1012.91081289	63.30692581	
Total	19	11554.90659137		

Média: 55,7

CV (%): 15,07

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

ANEXO 26 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL NÚMERO MÉDIO DE RAÍZES EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Meios de cultura	3	1.30778684	0.43592895	21.5490 *
Resíduo	16	0.32367472	0.02022967	
Total	19	1.63146156		

Média: 1,57

CV (%): 9,02

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

ANEXO 27 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL COMPRIMENTO MÉDIO DE RAÍZES EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Meios de cultura	3	4.37000000	1.45666667	28.8449 *
Resíduo	16	0.80800000	0.05050000	
Total	19	5.17800000		

Média: 2,91

CV (%): 7,72

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

ANEXO 28 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL ALTURA DA PARTE AÉREA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Meios de cultura	3	5.94504000	1.98168000	20.7007 *
Resíduo	16	1.53168000	0.09573000	
Total	19	7.47672000		

Média: 2,83

CV (%): 10,90

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

ANEXO 29 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL MASSA FRESCA TOTAL EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Meios de cultura	3	0.00756560	0.00252187	34.5680*
Resíduo	16	0.00116726	0.00007295	
Total	19	0.00873286		

Média: 0,16

CV (%): 5,32

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

ANEXO 30 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA APÓS 30 DIAS DA ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS ENRAIZADAS *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA COM DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES DE AUXINA.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Meios de culturas	6	11536.6953	1922.7825	30,8*
Resíduo	28	1747.1228	62.3972	
Total	34	13283.8182		

Média: 37,7

CV (%): 20,9

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

ANEXO 31 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA APÓS 60 DIAS DA ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS ENRAIZADAS *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA COM DIFERENTES TIPOS E CONCENTRAÇÕES DE AUXINA.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Meios de culturas	6	10964.4927	1827.4154	32.2 *
Resíduo	28	1587.0777	56.6	
Total	34	12551.5704		

Média: 36,3

CV (%): 20,6

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

ANEXO 32 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA APÓS 30 DIAS DA ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS ENRAIZADAS *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Meios de culturas	3	9695.6760	3231.8920	228.32*
Resíduo	16	226.4811	14.1550	
Total	19	9922.1571		

Média: 59,5

CV (%): 6,3

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

ANEXO 33 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA APÓS 60 DIAS DA ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS ENRAIZADAS *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Meios de culturas	3	10144.1417	3381.3805	111.969 *
Resíduo	16	483.1842	30.1990	
Total	19	10627.3259		

Média: 58,2

CV (%): 9,4

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

ANEXO 34 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA APÓS 30 DIAS DA ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS ENRAIZADAS *IN VITRO* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Meios de culturas	3	4002.9698	1334.3298	14.746*
Resíduo	16	1447.7212	90.4825	
Total	19	5450.7108		

Média: 67,7

CV (%): 14,02

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

ANEXO 35 RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA VARIÁVEL PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA APÓS 60 DIAS DA ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS ENRAIZADAS *IN VITRO* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Meios de culturas	3	4275.6725	1425.2241	23.0525*
Resíduo	16	989.2002	61.8	
Total	19	5264.8		

Média: 63,9

CV (%): 12,2

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