“MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATAÇÃO DE MOSQUITINHO,

Gypsophila paniculata L. cv. Bristol Fairy
(CARYOPHYLLACEAE)”

ROBERTO JUN TAKANE

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Antônio A. Lucchesi

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de Mes-
tre em Ciências. Área de Concentração: Fisiolo-
gia e Bioquímica de Plantas.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Abril - 1997

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Takane, Roberto Jun

Micropropagação e aclimação de *Gypsophila paniculata* L. cv. Bristol Fairy
"mosquitinho" (CARYOPHYLLACEAE) / Roberto Jun Takane. - - Piracicaba, 1997.
47 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
Bibliografia.

1. Aclimação 2. Mosquitinho 3. Propagação "in vitro" I. Título

CDD 583.152
635.93152

"MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATAÇÃO DE MOSQUITINHO,

Gypsophila paniculata L. cv. Bristol Fairy
(CARYOPHYLLACEAE)"

ROBERTO JUN TAKANE

Aprovada em: 06.06.97

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Antônio Augusto Lucchesi (Orientador)
Prof. Dr. Antônio Natal Gonçalves
Prof. Dr. Carlos Eduardo Ferreira de Castro

ESALQ / USP
ESALQ / USP
IAC / SP

Prof. Dr. Antônio Augusto Lucchesi
(Orientador)

Ao meu Pai, Ikuro Takane, por ter me
legado o espírito da luta e humildade,

a minha mãe, por ter me ensinado o
espírito da determinação e da
compreensão,

e a Tchan, minha segunda mãe, que
coordenou a minha vida, na fase em
que mais necessitei.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Antônio Augusto Lucchesi, pelas orientações, paciência e principalmente por sua amizade.

Ao Professor Dr. Antônio Natal Gonçalves, pelo grande apoio, na fase mais crítica da minha pós graduação, e pelo uso do laboratório de cultura de tecidos vegetais do Departamento de Silvicultura da ESALQ/USP.

Ao Professor Dr. Marcílio de Almeida, pelas orientações iniciais, deste trabalho, sem as quais seria impossível a realização deste.

Aos Professores, Técnicos e Secretárias do Departamento de Botânica que sempre me apoiaram nos trabalhos que realizei.

Ao Professor Dr. Heitor W.Studart Montenegro (*in memorian*), pelos estímulos, e ensinamentos da vida.

Ao amigo Engenheiro Florestal Aguinaldo Scarassati, companheiro quando nas horas mais difíceis do caminho.

Ao técnico Roberto Romanini(Beto), pelo apoio no preparo dos experimentos.

Aos colegas de República Fernando Mauro (Fletz) e Roberto M.de Castro (Gepeto), pela amizade e pelas boas recordações.

A CAPES, pela bolsa de estudos concedida, sem a qual seria impossível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. <i>Gypsophila paniculata</i>	3
2.2. Propagação	4
2.2.1. Propagação através da semente	4
2.2.2. Propagação por estaquia	4
2.2.3. Propagação <i>in vitro</i>	5
2.2.4. Vitrificação	9
2.2.5. Aclimação	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Coleta do material e escolha dos explantes	15
3.2. Micropropagação propriamente dita	18
3.3. Aclimação	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
5. CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1- Efeito das diferentes concentrações do BAP na frequência de vitrificação (%) após 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	23
2- Número de gemas adventícias após 40 dias de cultivo <i>in vitro</i> de <i>G.paniculata</i> nos diferentes tratamentos.....	26
3- Crescimento em altura (cm) das gemas nos diferentes tratamentos após 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	26
4- Peso (mg) da Matéria Seca da Raiz (PMSR), das plântulas inoculadas em meio de cultura MS modificada com diferentes concentrações de NAA e IBA.....	28
5- Peso (mg) da Matéria Seca da Parte Aérea (PMSPA), das plântulas inoculadas em meio de cultura MS modificada com diferentes concentrações de NAA e IBA.....	29
6- Crescimento em altura (cm) das plântulas nos diferentes tratamentos após 40 dias de cultivo <i>in vitro</i>	30

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1- Composição de meio de cultura básico de MURASHIGE & SKOOG (1962), e o meio modificado segundo TAKANE <i>et al</i> (1994)	17
2- Número de explantes de <i>G.paniculata</i> L. vitrificado, 40 dias após a inoculação em meio de cultura MS modificado	24
3- Número de brotações e crescimento em altura (cm) dos explantes de <i>G.paniculata</i> L., 40 dias após a inoculação nos meios de cultura MS modificado	25
4- Peso (mg) da matéria seca das raízes, da parte aérea e crescimento em altura (cm) dos explantes de <i>G.paniculata</i> 30 dias após a inoculação nos meios de cultura MS modificado, com diferentes concentrações de NAA e IBA	27
5- Sobrevivência (%) das plântula aclimatadas <i>ex vitro</i>	32
6- Dados médios do comprimento (cm) e da produção de matéria seca (mg) da raiz, e da parte aérea das plântulas aclimatadas sob diversos tratamentos de sombreamento, após 40 dias de cultura	35

MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATAÇÃO DE *Gypsophila paniculata* L. "MOSQUITINHO" cv. Bristol Fairy (CARYOPHYLLACEAE).

Autor: ROBERTO JUN TAKANE

Orientador: ANTÔNIO. A. LUCCHESI

RESUMO

Este trabalho teve por finalidade desenvolver um protocolo para a micropropagação de *Gypsophila paniculata* L., e a sua subsequente aclimação em condições especiais de casa de vegetação. A micropropagação foi realizada inicialmente com o emprego da técnica de cultura de meristemas para limpeza clonal. Uma vez obtidos as gemas, somente gemas apicais foram utilizadas no processo de multiplicação *in vitro*. Os explantes foram inoculados em meio de cultura contendo sais de MURASHIGUE & SKOOG (1962) modificado, com $1760,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de CaCl_2 , com diferentes combinações das concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (NAA). Estes explantes foram deixados em câmara de crescimento sob uma temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. Após 30 dias, a combinação de auxina (NAA) e citocinina (BAP) que resultou melhor perfilhamento, foi o meio contendo $1,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de NAA, com uma média de 11 perfilhos por explante. Foi verificado também que doses elevadas de BAP resultaram em maior taxa de hiperidratação (vitricificação).

Para a aclimação, foram utilizadas como explantes gemas apicais com tamanho padronizado em 1,5cm, que foram reinoculadas no mesmo meio de cultura, mas com diferentes concentrações de NAA(0,25; 0,50; 1,00 e 1,50mg.L⁻¹) e IBA (0,25; 0,50; 1,00 e 1,50mg.L⁻¹), além da testemunha (tratamento controle). Após 30 dias, estas plântulas enraizadas foram acondicionadas em casa de vegetação de um produtor desta mesma espécie, na região de Atibaia/SP. As plântulas foram acondicionadas em bandejas plásticas com substrato comercial, Plantmax, sob sombreadores de 50%, onde foi verificado a eficiência do tratamento de enraizamento *in vitro* e o índice de sobrevivência de cada tratamento. O tratamento que apresentou maior índice de sobrevivência foi com as plântulas não tratadas com reguladores vegetais, com 81% de sobrevivência. Após esta, utilizando-se as plântulas já enraizadas, sem a utilização dos reguladores vegetais, foi realizado o teste de sombreamento na aclimação. Os materiais utilizados foram: Tela branco, Tela verde, Sombreadores de 18%, Sombreadores de 50% e Sombreadores de 80%. Os melhores resultados foram obtidos com plântulas sob sombreadores de 50% e 80%, porém, as plântulas sob o sombreadores de 80%, apresentaram sintomas de estiolamento com coloração verde translúcida e internódios mais espaçados.

MICROPROPAGATION AND ACCLIMATIZATION OF *Gypsophila paniculata* L. "MOSQUITINHO" cv. Bristol Fairy (CARYOPHYLLACEAE).

SUMMARY:

The objective of this work was to develop an alternative way for the micropropagation of *Gypsophila paniculata* L. cv. 'Bristol Fairy'. Initially, the micropropagation was achieved with the use of meristem culture tecnicas for clonal cleaning and once the buds were obtained, only the shoot tips were used in the process of multiplication *in vitro*. The explants were used in culture medium containing salts of MURASHIGE & SKOOG (1962) modified with 1.760 mg. L⁻¹ of CaCl₂ with concentration of 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthaleneacetic acid (NAA) in different concentration. These explants were placed in a growing chamber under a constant temperature of 25°C ± 2°C and fotoperiod of 16 hours. After 40 days the combination of auxin (NAA) and cytokinin (BAP) that resulted in a better lateral bud multiplication was the medium containing 1.25mg.L⁻¹ of BAP and 0.05mg.L⁻¹ of NAA, with an average of 11 bud per explant. High doses of BAP resulted in greater rate of vitrification.

For the acclimatization, only shoot tips with 1,5cm were reinoculated in the same medium with different concentration of NAA (0,25; 0,50; 1,00 and 1,50mg.L⁻¹) and IBA (0,25; 0,50; 1,00 and 1,50mg.L⁻¹), beyond reinoculated in the medium without vegetable regulators. After 30 days, these plantlets were transplanted in the

plastic tray with comercial substrate (Plantmax) and allowed under sombrite 50% in the green house of one *Gypsophila paniculata* grower at Atibaia city in São Paulo State. The treatment that most rate survived showed were the plantlets without vegetable regulators used with 81% of survived. For the shade testing, were used only plantlets rooted without vegetable regulators treatments. The materials used for shadins were: White 'clarite, Green 'clarite, Sombrite 18%(shade), Sombrite 50%(shade), and Sombrite 80%(shade). The best results were obtained with Sombrite 50% and 80% (shade), but sombrite 80%(shade) showed plants with slender and tranlucid green leaves.

1. INTRODUÇÃO

A produção de plantas em condições de laboratório é uma prática rotineira na agroindústria de flores em países como Holanda, França, Espanha, Japão, e dentre os países sul americanos, principalmente a Colômbia e o Equador. Onde esta prática é um passo comum na produção de flores. No Brasil, a micropropagação já está se tornando uma realidade no sistema de produção.

A propagação *in vitro*, já é um método consagrado pelos resultados alcançados, tais como a produção de plantas mais uniformes e mais saudáveis, velocidade de crescimento superior aos métodos convencionais, produção em escala comercial exigindo menos espaço físico, e através da cultura de meristemas, a possibilidade da obtenção de plantas isentas de vírus e outros patógenos, resultando mudas de alta qualidade (CROCOMO,1986).

Gypsophila paniculata L.(CARYOPHYLLACEAE), é uma planta ornamental, cujas flores são conhecidas comercialmente como "mosquitinho" ou ainda "branquinha". São muito utilizadas como flores de "enchimento", e são complemento considerado quase que obrigatório nos arranjos ou buques florais.

Nestes últimos anos, observa-se a grande expansão desta cultura no Estado de São

Paulo, principalmente nos principais pontos de comercialização (CEAGESP e o Veiling/Holambra).

Somados ao processo de reprodução vegetativa, na qual se utiliza praticamente a estaquia convencional, que na maioria das vezes apresenta problemas de contaminação e baixa eficiência na produção final das mudas.

Com todos estes parâmetros, mais as escassas revisões envolvendo pesquisas de micropropagação com esta espécie, procurou-se neste trabalho, desenvolver protocolos alternativos para a micropropagação e aclimação desta espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Gypsophila paniculata*

A palavra *Gypsophila* vem da união de duas palavras gregas que são: *Gypso*, que significa gesso e *phillum*, que exprime afinidade.

A família Caryophyllaceae Lindl, compreende cerca de 80 gêneros e 2.000 espécies com ampla distribuição em todas as regiões do globo (GEMTCHUJNICOV,1976). Algumas espécies, são conhecidas e muito cultivadas na floricultura moderna. Onde, possuem elevada importância econômica em muitos países. São exemplos, as espécies do gênero *Dianthus* como o *Dianthus caryophyllus*, que são os craveiros, e principalmente as espécies do gênero *Gypsophila*, sendo as mais importantes a *Gypsophila elegans* e a *Gypsophila paniculata* (ANON,1978).

A *Gypsophila paniculata* é uma planta originária da Asia Ocidental, região onde predomina o clima temperado. São plantas arbustivas arredondadas chegando a ter um metro de altura (BARROSO,1978).

No Brasil, são chamados comercialmente de "mosquitinho" ou ainda "branquiha". São utilizadas principalmente no arranjo de buquês florais.

Nos últimos anos, a produção de *Gypsophila paniculata*, tem apresentado um aumento acentuado nos principais locais de comercialização, que são o CEAGESP-SP e o leilão da HOLAMBRA, localizado no município de Holambra-SP (YANAGIZAWA,1991).

2.2. Propagação

A propagação desta espécie pode ser realizada através dos métodos: por semente, vegetativamente através da estaquia e pelas técnicas de cultura de tecidos vegetais.

2.2.1. Propagação através da semente

A propagação através da semente não é usual entre os floricultores no Brasil, pois, as sementes são todas importadas, e difíceis de serem encontradas no comércio, principalmente da cultivar utilizada.

2.2.2. Propagação por estaquia

É usual no Brasil a propagação vegetativa através da estaquia. Mas esta prática apresenta várias dificuldades, por requerer boa infraestrutura, como casa de vegetação específica para enraizamento, assepsia no manejo do material vegetativo. Onde, frequentemente ocorre

contaminações das mudas, resultando baixa porcentagem do enraizamento das estacas.

2.2.3. Propagação *in vitro*

A propagação *in vitro* ou micropropagação é um método biotecnológico indiscutivelmente consagrado perante as mais diferenciadas formas de propagação vegetativa, principalmente quando se trata de espécies ornamentais e frutíferas.

São várias as vantagens que a multiplicação clonal *in vitro* apresenta. Dentre algumas, SAGAWA & KUNISAKI (1990) cita a alta velocidade da multiplicação, controle eficiente das doenças, transporte facilitado pelo tamanho reduzido, e a necessidade de pequenas partes da planta para a produção em escala comercial. LIBANIO & WITMER (1987) estudando as diferenças entre plantas de crisântemo (*Chrysanthemum morifolium*) propagadas *in vitro* e as propagadas *in vivo* constataram que o material propagado *in vitro* é mais precoce e homogêneo apresentando expressiva superioridade na produção e qualidade das flores. Trabalho semelhante foi conduzido com begônia (*Begonia hiemalis*) por TAKAYAMA & MISAWA (1982), que obtiveram plantas mais homogêneas com grande valor comercial.

Sabe-se que as primeiras espécies vegetais propagadas pela técnica de cultura de tecidos, foram as plantas ornamentais (MOREL, 1960). Este mesmo autor isolou através da cultura de meristemas, orquídeas do gênero *Cymbidium*. Dessa forma, plantas isentas de vírus, propiciou grande aceitação no comércio da floricultura na época. MURASHIGUE (1974) e MII *et al.* (1990) também procuraram isentar material vegetal de vírus.

Mais tarde, BETTI(1991) em seu trabalho, demonstrou a importância crescente da cultura de tecidos vegetais, principalmente na obtenção de material propagativo, isento de vírus.

Para superar o problema da contaminação patogênica destes vírus, o cultivo de ápices caulinares e/ou meristemas tem sido usado com êxito em programas de micropropagação (CROCOMO, 1988), uma vez que nestes sítios de intensa atividade celular, comumente há baixa ou nenhuma frequência de microorganismos.

Para a limpeza clonal, é comum a utilização de ápices meristemáticos contendo um ou mais pares de primórdios foliares. Com relação ao cravo (*Dianthus caryophyllus*), STONE(1968) conseguiu produzir plantas de cravos livres dos vírus CarMV, CRSV e CarLV, aplicando técnicas de meristemas, chegando a obter 64% de plantas livres desses patógenos a partir dos meristemas apicais.

No entanto, todo e qualquer explante para que haja a morfogênese, esta depende do meio de cultura, tamanho da própria planta e do estado fisiológico da planta doadora. O tamanho destes ápices varia entre as diferentes espécies, sendo comum, de acordo com SUTTER & LANGHANS (1979), entre 0,1 a 0,5mm de comprimento.

Com relação ao tamanho, STONE (1963) trabalhando com explantes de cravo menores que 0,5mm, obteve como resposta a baixa frequência de vírus, bactérias ou fungos, porém, estes mesmos explantes apresentaram baixo índice de sobrevivência, o que mostra que ápices menores, possuem pequena possibilidade de estarem contaminados por microorganismos; no entanto, possuem também, baixa capacidade de regeneração.

Com relação ao cravo, ainda sobre a dimensão do explante DAVIES *et al.*(1977);

GUKASYAN *et al* (1977) e ainda PHILLIPS & MATTHEUS (1960), utilizaram com sucesso, ápices meristemáticos com um até tres pares de primórdios foliares, medindo até 5mm, o que indica a importância destes primórdios foliares no desenvolvimento morfogênético do explante.

No mundo, estima-se que 200 a 300 milhões de plântulas estão sendo produzidas por ano pela técnica de cultura de tecidos. Neste contexto, a propagação de plantas ornamentais engloba mais de 36 famílias e 75 gêneros. Dentre as plantas ornamentais, as orquídeas, os crisântemos e os cravos dominaram a fase inicial da micropropagação, depois desenvolveram-se protocolos para outras plantas ornamentais, principalmente as envasadas.

Até o ano de 1988, alcançaria o número, aproximado de 300 espécies micropropagadas (MURASHIGE, 1974). Estima-se, atualmente, que 1000 novas espécies tenham protocolos de micropropagação definidos. O prognóstico é que, ao final deste século, mais de 3000 genótipos serão micropropagados, principalmente os compreendidos entre as plantas ornamentais (DEBERGH, 1986).

DEBERGH & MAENE (1981) e DEBERGH & READ (1991) estabeleceram o conceito de estágios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*, que são:

FASE 0- Coleta das matrizes doadoras de explantes;

FASE 1- Obtenção de culturas assépticas;

FASE 2- Multiplicação das gemas;

FASE 3- Alongamento e enraizamento das plântulas *in vitro*;

FASE 4- Aclimação e ou enraizamento *in vitro*.

Dentre os poucos trabalhos publicados sobre a propagação da espécie *Gypsophila paniculata* L., destaca-se os de HILL (1967) e KUSEY *et alii* (1980).

HILL (1967) observou que a concentração de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético (NAA), induz rizogênese. O mesmo autor, utilizando o ácido 2-4 diclorofenoxiacético, observou que a mesma dosagem usada com este regulador vegetal, resultou somente na produção de calos.

KUSEY *et alii* (1980) determinaram que o meio contendo sais de MURASHIGUE & SKOOG (1962) suplementado com $0,4\text{ mg.L}^{-1}$ de tiamina HCl, 30g.L^{-1} de sacarose, 100mg.L^{-1} de mesoinositol mais $7,0\text{g.L}^{-1}$ de agar, com pH ajustado para 5,6, contendo $0,05\text{mg.L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético (NAA) e $1,0\text{mg.L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP), provocou organogênese direta, a partir de explantes de gema apical.

Além da *Gypsophila paniculata*, existem trabalhos realizados com cravos (*Dianthus caryophyllus* L.). HACKETT & ANDERSON (1967), trabalharam com ápice caulinar e obtiveram calos, em meio WHITE(1943) ou MURASHIGUE & SKOOG (1962); com uma concentração de $1,0\text{mg.L}^{-1}$ de NAA, houve uma ampla porcentagem de regeneração. Com a inoculação de explantes em meio basal com 5 vezes a concentração dos sais inorgânicos, mais $2,0\text{mg.L}^{-1}$ de NAA, obtiveram uma produção de calos, estes calos foram repicados e cultivados no mesmo tipo de meio mas com uma concentração de 5mg/l de ANA. Observaram organogênese indireta, e com 6 a 8 semanas puderam isolar as plântulas dos calos.

EARLE & LANGHANS (1975) propagaram cravo em meio de cultura contendo

concentrações de reguladores vegetais quase que semelhante às de KUSEY *et alii* (1980). Estes autores utilizaram ápices caulinares como explantes, que foram inoculados em meio sólido contendo $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de cinetina e $0,1\text{mg.L}^{-1}$ de NAA. Após o surgimento dos primeiros perfilhos, estes foram transferidos para meio líquido com rotação de 1rpm. Com este procedimento obtiveram grande quantidade de perfilhos a partir dos explantes.

Ainda com relação a propagação de cravos, ENGVILD (1972), trabalhou com a cultura de calos e suspensão de células desta mesma espécie. A cultura de calos foi mantida em meio com a metade dos sais de MURASHIGUE & SKOOG (1962), 3% de sacarose, 100mg.L^{-1} de mesoinositol, $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de tiamina HCl, piridoxina HCl e ácido nicotínico com $10,0\text{g.L}^{-1}$ de agar. Utilizando este meio de cultura com $3 \times 10^{-6}\text{M}$ de ácido indoleacético (IAA), combinado com $3 \times 10^{-6}\text{M}$ de benzilaminopurina (BAP), conseguiu-se um crescimento ótimo dos calos. Diversas tentativas para a indução da organogênese em calos foram realizadas, mas nenhuma apresentou sucesso.

2.2.4. Vitrificação

Neste tipo de propagação (técnicas de cultura de tecidos), na qual se utiliza na maioria das vezes, como explante algumas células primordiais, ou seja meristemática, esta pode apresentar uma série de problemas, entre elas, variações anormais de ordem anatômica, morfológica ou ainda fisiológica, que são observadas em algumas espécies. Estas anomalias foram denominadas inicialmente de vitrificação. Trata-se de uma reação de hipersensibilidade às condições de estresse do meio de cultura onde vários fatores

interagem simultaneamente interferindo nas principais vias metabólicas, como na fotossíntese, na respiração e na transpiração. Esta anomalia pode ser também denominada como estado terapeuta, hiperidratação, translucência e intumescência (CUZZUOL, 1993).

A vitrificação tem demonstrado ser um desafio na micropropagação *in vitro*.

Em 1991, ZIV e outros autores listaram 30 espécies vegetais com problemas de vitrificação quando propagadas *in vitro*. A consequência desta ou destas reações são caracterizadas por desordens fisiológicas generalizadas, como exemplo: folhas e caules entumecidos e quebradiços, hipertrofia celular, ausência de dominância apical e caules curtos. Possivelmente, a causa principal de tais sintomas seja uma deficiência de lignina e celulose da parede celular (CUZZUOL, 1993).

O grande problema da vitrificação se dá na baixa taxa de sobrevivência das plantas vitrificadas em condições de casa de vegetação, o que torna inviável projetos de micropropagação para muitas espécies sensíveis a este tipo de fenômeno.

2.2.5. Aclimação

Segundo SLUIS & WALKER (1985), CROCOMO (1988), a fase de aclimação, é uma das fases mais delicada na biotecnologia de plantas. A ausência de domínio das técnicas ligadas a aclimação, como controle de umidade, iluminação e temperatura, pode quebrar a continuidade da produção, pelo delicado método de cultura de tecidos vegetais (GROUT & CRISP, 1977; WARDLE *et al.*, 1979).

SLUIS & WALKER (1985) comentam ainda, o alto custo da produção de mudas pelo processo de biotecnologia, que é dado pelo resultado da alta porcentagem de perdas na fase de aclimação.

Acredita-se que a principal causa da baixa sobrevivência seja dada pela perda excessiva de água pelas plantas em aclimação (BRAINERD & FUCHIGAMI, 1982; SUTTER & LANGHANS, 1982). Plantas como brassicas e cravo cultivados *in vitro* apresentaram deficiência de cera epicuticular cuja função é limitar as perdas de água através da transpiração (GROUT & ASTON, 1978; SUTTER & LANGHANS, 1979 e 1982).

Baseado nos estudos relacionados à formação de cera epicuticular com o ambiente, GROUT & ASTON (1977) atribuíram à alta umidade nos frascos de cultura como o fator responsável pela deficiência de epicutícula. Pesquisando este fator, SUTTER & LANGHANS (1982) e WARDLE *et al.* (1983) estimularam a síntese da epicutícula reduzindo a umidade nos frascos para 35%.

A redução da umidade pode ser conseguida mudando o sistema de vedação dos frascos com a utilização de tampas plásticas ou de algodão. CUZZUOL (1993), obteve em seu trabalho índices satisfatórios de sobrevivência, utilizando a vedação por algodão, na aclimação de cravo.

Foram relatados também alterações estruturais dos estômatos em plantas crescidas *in vitro*. Estudos de microscopia eletrônica revelaram que em todas espécies observadas, os estômatos permaneciam abertos nas condições *in vitro*, e inábeis ao fechamento por períodos variados quanto as plantas eram transferidas para a casa de vegetação (WARDLE

et al., 1983)

Ainda com relação aos cuidados com as plântulas na fase anterior a sua aclimação, WARDLE *et al.* (1983), pesquisaram a possibilidade do enrigescimento da parede celular com o crisântemo (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat) e com a couve flor (*Brassica oleracea* L. 'botritis'), aumentando a concentração de agar no meio de cultura e diminuindo a umidade relativa do meio a 80%; mais tarde SHORT *et al.* (1987) e SMITH *et al.* (1990) em seus trabalhos também com o crisântemo, obtiveram uma melhor eficiência na aclimação com plântulas tratadas em meio de cultura com a umidade do ar controlada. As plântulas nessas condições apresentaram folhas mais espessas, incrementando a abertura e fechamento dos estômatos, e ainda o aumento da espessura da camada de cutícula, acreditando ser estes os fatores para a resistência ao murchamento e posterior morte das plântulas em aclimação, oriundas da propagação *in vitro*.

MARIN *et al.* (1988) em seu trabalho com *Prunus* sp., observaram que 75% dos estômatos fecharam após 15 minutos em condições *ex vitro*, sendo registradas baixas perdas de água. Em maçã o período de abertura dos estômatos foi prolongado seguido de alta taxa de transpiração, porém quando os frascos de cultura foram abertos e expostos à umidade relativa de 30 a 40% durante 5-6 dias em laboratório, os estômatos responderam satisfatoriamente às condições ambientais indutoras ao seu fechamento (BRAINERD & FUCHIGAMI, 1981).

Para cerejeira, bastou uma exposição de uma hora às condições laboratoriais para que 70% dos estômatos se fechassem (SUTTER, 1988).

HASEGAWA *et al.* (1973), utilizaram para a aclimação de *Asparagus*

officinalis L., sombreamento de 80% (Saran cloth cover), obtendo o melhor resultado em índice de sobrevivência. LAFORGE *et al.*(1991), em seu trabalho com *Asparagus officinalis* L., a framboesa (*Rubus idaeus* L.) e morango (*Fragaria anasa* Duch.), Obtiveram um grande incremento na matéria seca destes materiais durante a aclimação com alta intensidade de luz e alta concentração de CO₂, mas pequena porcentagem de crescimento na aclimação *in vitro*, com alta intensidade e pequena concentração de CO₂. Este mesmo resultado foi também obtido por NAVARRO *et al.* (1994) com banana (*Musa AAA* cv.Petite Naine), os quais obtiveram um incremento acentuado no crescimento de acordo com o fornecimento de alta intensidade luminosa ($240\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), mas juntamente com alta concentração de CO₂ (4%).

A atividade fotossintética em cultura de células cultivadas em meio sintético foram estudadas por YAMADA *et al.*(1978) e BARZ & HUSEMANN (1982), onde concluíram que as clorofilas destas células perderam a capacidade de suprirem os carboidratos necessários para o desenvolvimento, células por tanto, dependentes de uma fonte externa de carboidratos. Uma situação similar, provavelmente exista para plântulas inteiras em fase de aclimação, embora existam poucas informações a respeito (GROUT & ASTON, 1978).

Em plantas de morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch, cv.Gento) micropropagadas, observou-se que as folhas, produzidas durante a fase *in vitro*, não fixaram carbono suficiente para o desenvolvimento da planta sem uma fonte adicional de carbono, sendo essas primeiras folhas, importantes talvez, somente como fonte de reserva de outros nutrientes (GROUT & MILLAN, 1985).

Foi também observado que, existe uma correlação negativa entre índice de sobrevivência com concentração de auxina no pré-enraizamento, ou seja, quanto maior a concentração da auxina no pré-enraizamento das plântulas, menor é índice de sobrevivência destas. Este fato foi observado por CUZZUOL (1993) em cravo (*Dianthus caryophyllus*) e também por HASEGAWA *et al.*(1973) em *Asparagus officinalis* L. sob alta intensidade luminosa.

3.MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado em duas etapas: a primeira, de micropropagação, foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Ciências Florestais da E.S.A."Luiz de Queiroz" no Campus da USP, em Piracicaba-SP. A segunda fase foi conduzida em condições de casa de vegetação de um produtor na região de Atibaia,SP, a 65 Km da capital.

3.1 Coleta do material e escolha dos explantes

Foram coletados como material inicial, gemas apicais com tamanho padronizado de 2,5cm. A coleta foi realizada em estufa de um produtor na região de Atibaia,SP (65km da capital) às 7:00 horas da manhã, no dia 23 de setembro de 1994, em dia ensolarado com temperatura no interior da estufa à 23,7°C. Todas as gemas foram coletadas de plantas de *Gypsophila paniculata* L., em fase de crescimento vegetativo, com aproximadamente 40 dias após o plantio.

O material coletado foi esterilizado inicialmente em água corrente com detergente comercial por 15 minutos e lavados com água destilada. A seguir, o material foi

mergulhado em solução de tetraciclina a 1% por 4 minutos, no interior da câmara de fluxo contínuo; em seguida, mergulhado em solução de hipoclorito de sódio (água sanitária comercial) 20%(v/v) durante 20 minutos, e finalmente em, álcool 70°GL por 2 minutos. Em seguida, o material foi lavado em água destilada/autoclavada. Com auxílio de bisturi, pinças e estiletes assépticos sob o microscópio estereoscópio foram retirados os ápices meristemáticos medindo aproximadamente 0,5mm; cada ápice contendo 2 primórdios foliares. Estes ápices foram inoculados em meio de cultura contendo sais de MURASHIGUE & SKOOG (1962), acrescidos com 30g.L⁻¹ de sacarose, 0,4mg.L⁻¹ de Tiamina HCl, 100mg.L⁻¹ de mioinositol (TABELA 1) e ainda 0,05mg.L⁻¹ de ácido naftaleno acético (NAA) e 1,0mg.L⁻¹ de benzinoaminopurina (BAP), conforme KUSEY *et al* (1980).

Todos os meios de cultura foram ajustado para pH=5,8, em pHmetro B371 (Mícronal) com a condutividade elétrica (EC) medindo 6,54mS.cm⁻¹, tomados em condutivímetro de mesa CAI50 (Aciel).

TABELA 1 - Composição do Meio de Cultura Básico de MURASHIGUE e SKOOG (1962), e o meio MS modificado segundo TAKANE *et al* (1994).

	Meio MS (1962) (mg.L ⁻¹)	Meio MS modificado (mg.L ⁻¹)
Macronutrientes:		
NH ₄ NO ₃	1.650	1,650
KNO ₃	1.900	1.900
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440	1.760
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170
Micronutrientes:		
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
KI	0,83	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	37,3	37,3
Na ₂ EDTA	27,8	27,8
Glicina	2,0	--
Ácido nicotínico	0,5	--
Piridoxina.HCl	0,5	--
Tiamina.HCl	0,1	0,1
Mio-inositol	100	100
Sacarose	30.000	30.000

Utilizou-se neste trabalho, tubos de ensaio (15x2,5cm), com 10 ml de meio de

cultura em cada tubo, fechados com tampas de aço inox. Os meios foram autoclavados sob uma pressão de 137 kg.cm^{-2} , à uma temperatura de 121°C por 15 minutos.

A seguir a inoculação dos explantes, estes foram acondicionados em câmara de crescimento sob uma temperatura constante de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob uma iluminação de $75 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ de intensidade luminosa (lâmpadas fluorescentes luz do dia) por um fotoperíodo de 16 horas. A leitura da intensidade luminosa foi obtida com um radiômetro manual. Obtidas as plântulas regeneradas, após 40 dias, utilizou-se somente gemas apicais das plântulas não vitrificadas, com tamanho padronizado de 1,5 cm.

3.2 Micropropagação propriamente dita

Para se testar a influência das diferentes concentrações de fitorreguladores no meio de micropropagação, essas gemas foram reinoculadas novamente em meio de cultura com sais de MURASHIGE & SKOOG (1962) modificada com a concentração do sal $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ alterada para 1.760 mg.l^{-1} (TAKANE *et al*, 1994) com concentração de NAA variando entre 0,05; 0,10 e $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ combinados com diferentes concentrações de BAP: 0,25(T1); 0,50(T2); 0,75(T3); 1,0(T4); 1,25(T5) e $1,50 \text{ mg.L}^{-1}$ (T6). Todo o material foi acondicionado em câmara de crescimento sob as mesmas condições da primeira inoculação.

Foram obtidos os dados de perfilhamento (número de gemas), do crescimento em altura (cm) dos explantes, e, a frequência de vitrificação após 40 dias de inoculação.

A análise estatística utilizada foi através de delineamento experimental

inteiramente casualizado, com 20 repetições por tratamento e a comparação das médias foi realizada pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.3. Aclimação

Uma vez obtidas as plântulas, utilizou-se somente os ápices das gemas com 1,5cm de comprimento para a fase de enraizamento *in vitro*. Esta fase foi conduzida ainda no laboratório de cultura de tecidos vegetais do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

Os ápices das gemas foram inoculadas em meio de cultura MS com diferentes concentrações de IBA (0,0; 0,25; 0,50; 1,00 e 1,50mg.L⁻¹), e NAA (0,0; 0,25; 0,50; 1,00 e 1,50mg.L⁻¹), em frascos de Enlarmeyer de 250 ml, contendo 50 ml de meio de cultura, fechados com tampas de algodão, a fim de ser analisado o enraizamento ainda na fase *in vitro*. Após 30 dias, foi feita a medição das alturas das plântulas e logo após, estas foram secas em estufas a 100° C por uma semana, onde foram coletados os pesos da matéria seca da parte aérea e da raiz.

As plântulas obtidas *in vitro*, inicialmente foram acondicionadas em casa de vegetação de um produtor de *Gypsophila paniculata* L.cv. 'Bristol Fairy', da região de Atibaia,SP, localizado a 65 km da cidade de São Paulo, para se verificar a eficiência do enraizamento *in vitro*, e o índice de sobrevivência destas plântulas. A casa de vegetação utilizada com a cobertura em formato de arco, possuía uma área total de 50 m², sendo esta, toda construída de madeira, apresentando o pé direito de 2,5 metros. A cobertura

constituída de filme plástico transparente de 150 micrometros de diâmetro, possuindo proteção lateral, também, com filme plástico do mesmo material, com uma altura de 1,5m a partir do solo. As plântulas foram acondicionadas em bandejas de polietileno preto com 24 células, tendo cada célula, a dimensão de 6x6x6cm, com substrato comercial Plantmax, protegido com material de sombreamento 50%, tanto superficialmente, a um metro da bandeja, como lateralmente.

Procurou-se observar inicialmente, o efeito dos diferentes tipos de sombreamento. Foram utilizados vários materiais para sombreamento nesta fase de aclimação. Como clarite foram utilizados dois modelos: o de coloração branca e o de coloração verde. Como sombrites foram utilizados quatro modelos, entre eles, o de 18%, o de 30 %, o de 50% e o de 80% de sombreamento.

Todos estes materiais foram instalados a um metro de altura das bancadas, onde foram acondicionadas as bandejas com as plântulas. As laterais também foram protegidas com sombrites e clarites respectivas dos tratamentos, a fim de evitar-se as interferências dos raios solares nos períodos do nascer e ao por do sol. Todos os tratamentos receberam 2 irrigações, uma no período da manhã (7:00hs) e outra no período da tarde (17:30hs).

Após quarenta dias, as mudas foram coletadas e analisadas. Os dados obtidos foram: altura das mudas e peso da matéria seca das raízes e da parte aérea das plântulas.

Toda análise estatística utilizada foi através do delineamento experiemntal inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento, e, a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% e 1% de probabilidade.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção das primeiras gemas em meio de cultura MS, suplementado com 0,4 mg.L⁻¹ de tiamina HCl 30 g.L⁻¹ de sacarose, 110 mg.L⁻¹ de mioinositol, 0,05mg.L⁻¹ de NAA, 1,0mg.L⁻¹ de BAP com 7g.L⁻¹ de agar, conforme publicado por KUSEY *et al* (1980), resultou em 5 repetições, uma média de 63,7% de vitrificação. Visando contornar esta alta incidência da vitrificação, procurou-se neste trabalho, diminuir a incidência desta, nesta fase de multiplicação de gemas.

Entende-se por vitrificação, variações anormais de ordem anatômica, morfológica ou ainda fisiológica, que são observadas em muitas espécies (ZIV, 1991).

Trata-se de uma reação de hipersensibilidade às condições de estresse do meio de cultura onde vários fatores interagem simultaneamente interferindo nas principais vias metabólicas como na fotossíntese, na respiração e na transpiração. Esta anomalia pode ser também denominada como estadoterapeuta, hiperidratação, translucência e/ou intumescência. A consequência desta ou destas reações são caracterizadas por desordens fisiológicas generalizadas, como exemplo: folhas e caules intumescidos e quebradiços, hipertrofia celular, ausência de dominância apical e caules curtos. Possivelmente, a causa principal de tais sintomas seja uma deficiência de lignina e celulose da parede celular (CUZZUOL, 1993).

Conforme a FIGURA 1, e a TABELA 2, pode ser observado que quanto maior a concentração da citocinina (BAP), maior foi a taxa de vitrificação. Sendo o tratamento T6 com $1,50\text{mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,05\text{mg.L}^{-1}$ de NAA, a que apresentou as maiores taxas, com 66% de vitrificação. Esta relação linear entre doses de BAP e frequência de vitrificação já foram constatadas por outros autores como VON ARNOLD & ERICSON (1984); GASPAR *et al* (1984) e CUZZUOL (1983) em cravo (*Dinathus caryophyllus*). A alta concentração de NAA, no meio de cultura ($1,25\text{mg.L}^{-1}$), fez diminuir a taxa de vitrificação, mas apresentou alto índice na formação de calos.

FIGURA 1: Efeito das diferentes concentrações de BAP na frequência de vitrificação (%), após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS modificado.

TABELA 2- Número de explantes de *G.paniculata* L. vitrificados, 40 dias após a inoculação em meio de cultura MS modificado (média de 20 repetições por tratamento).

Tratamentos (mg.L ⁻¹) BAP	Vitrificação dos explantes (Nº) (mg.L ⁻¹ NAA)		
	0.05	0.25	1.25
T1 – 0,25	0.78 cde	0.43 de	0.04 e
T2 – 0,50	0.90 cde	0.57 cde	0.13 e
T3 – 0,75	0.94 cde	0.98 cde	0.31 e
T4 – 1,00	0.89 cde	0.87 cde	0.31 e
T5 – 1,25	3.57 ab	1.56 bcd	0.87 cde
T6 – 1,50	6.25 a	2.43 bc	0.55 cde
F (Trat.)	10,5642		
CV (%)	5,458		

OBS: Letras diferentes, numa mesma coluna, indicam diferenças significativas entre as médias, pelo teste de TUKEY

Na TABELA 3, e FIGURAS 2 e 3, podem ser observados os resultados dos três tratamentos com diferentes dosagens de BAP em três diferentes concentrações de NAA, no número de brotações e no comprimento (altura) destas brotações. Verificou-se nitidamente que doses mais elevadas de BAP, com 0,05mg.L⁻¹ de NAA, estimulam um maior perfilhamento, até a dose de 1,25mg.L⁻¹ de BAP (T5). Na dosagens de 1,50mg.L⁻¹ de BAP (T6) houve uma pequena redução no número de gemas, possivelmente causada pela alta

taxa de vitrificação, como foi verificado também por DENCSO (1984), PAQUES (1991), PHAN (1991) e ZUCHERELLI (1979). A maior taxa de perfilhamento, resultou em menor taxa de crescimento em altura.

TABELA 3- Número de brotações e crescimento em altura (cm) dos explantes de *G. paniculata* L. 40 dias após a inoculação nos meios de cultura MS modificado (média de 20 repetições por tratamento)

Tratamentos (mg.L ⁻¹ BAP)	Número de Brotações (mg.L ⁻¹ NAA)			Comprimento (cm) (mg.L ⁻¹ NAA)		
	0.05	0.25	1.25	0.05	0.25	1.25
T1 – 0.25	2,9 BCDEF	2,3 DEFG	1,2 G	4,9 ABC	5,2 AB	3,7 DE
T2 – 0.50	3,6 BCD	2,5 CDEFG	1,3 G	4,3 CD	5,5 A	4,34 CD
T3 – 0.75	5,0 B	2,6 CDEF	1,3 G	3,5 E	4,7 BC	2,2 G
T4 – 1.00	8,7 A	3,5 CDEF	1,6 G	2,1 G	4,7 BC	2,1 G
T5 – 1.25	11,3 A	4,3 BC	1,7 FG	2,0 G	3,5 E	2,5 FG
T6 – 1.50	9,6 A	2,5 CDEFG	1,8 EFG	2,0 G	3,1 EF	2,2 G
F (Trat.)	41,0403			53,9927		
CV (%)	19,010*			19,418		

OBS: Letras diferentes, numa mesma coluna, indicam diferenças significativas entre as médias, pelo teste de Tukey

FIGURA 2 -Números de gemas adventícias após 40 dias de cultivo *in vitro* de *G.paniculata* nos diferentes tratamentos com NAA, em meio de cultura MS modificado.

FIGURA 3 - Crescimento em altura (cm) das gemas nos diferentes tratamentos, com NAA, após 40 dias de cultivo *in vitro*, em meio de cultura MS modificado.

TABELA4 – Peso (mg) da matéria seca das raízes, da parte aérea e crescimento em altura (cm) dos explantes de *G. Paniculata L.*, 30 dias após a inoculação nos meios de cultura MS modificado (TAKANE et al, 1994) com diferentes concentrações de ANA e AIB (média de 10 repetições por tratamento).

Tatamentos	Peso da mat. seca (mg)	Peso da mat. seca (mg)	Altura (cm)
	Raíz	Parte Aérea	Explantes
S0 – s/ regulador veg.	2,0 C a	29,3 ABC abc	3,8 ABC abc
S1 – 0,25mg.L ⁻¹ NAA	2,1 BC a	26,8 BC bc	4,2 AB ab
S2 – 0,50mg.L ⁻¹ NAA	2,7 AB a	33,2 A a	4,3 AB a
S3 – 1,00mg.L ⁻¹ NAA	2,3 ABC a	30,2 AB abc	3,3 CD bc
S4 – 1,50mg.L ⁻¹ NAA	2,0 C a	24,9 C c	3,0 D c
S5 – 0,25mg.L ⁻¹ IBA	2,0 C a	34,2 A a	4,5 A a
S6 – 0,50mg.L ⁻¹ IBA	2,3 ABC a	31,7 A ab	4,3 AB a
S7 – 1,00mg.L ⁻¹ IBA	2,6 ABC a	26,8 BC bc	4,0 ABC ab
S8 – 1,50mg.L ⁻¹ IBA	2,7 A a	18,5 E e	3,6 BCD abc
F (Trats)	4,661	17,7642	7,9439
CV (%)	12,337	8,145	9,544

OBS.: Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey ao nível de 5% (Maiúsculas) e 1% (Minúsculas)

Tal fato também foi constatado por BOUZA *et al* (1994) em *Paeonia suffruticosa*, DAIMON & MII (1991) em *Podocarpus macrophyllus*, CUZZUOL (1993), DAVIES *et al* (1977), e PHILLIPS & MATTHEWS (1960) em cravo (*Dianthus caryophyllus*). Observou-se que a elevação de NAA, nos tratamentos, não surtiu efeito favorável na formação de gemas, porém foi a concentração que mais estimulou o seu crescimento em altura. Já os tratamentos com $1,25\text{mg.L}^{-1}$ de NAA, não apresentou perfilhamento, como nos tratamentos anteriores, apresentando também baixo crescimento em altura, o que pode ser uma resposta a alta concentração deste regulador vegetal.

FIGURA 4- Peso (mg) da Matéria Seca da Raiz (PMSR) das plântulas inoculadas em meio de cultura MS modificado com diferentes concentrações de NAA e IBA.

Na fase de aclimação, o enraizamento *in vitro*, vedadas com tampas de algodão (CUZZUOL, 1993; GROUT & ALSTON, 1977; SUTTER & LANGHANS, 1982, MARIN *et al.*, 1988), pode ser visualizado pela TABELA 4, FIGURAS 4 e 5, onde os resultados apresentaram diferenças significativas ao nível de 5% com relação ao peso da matéria seca das raízes, sendo os tratamentos que se destacaram, foram os tratamentos S2, S3, S6, S7, S8.

FIGURA 5- Peso (mg) da Matéria Seca da Parte Aérea (PMSPA) das plântulas inoculadas em meio de cultura MS modificado, com diferentes concentrações de NAA e IBA.

Diferenças com relação ao peso da matéria seca foram também evidentes na parte aérea, destacando-se os tratamentos S0, S2, S3, S5, e S6. Com relação ao crescimento dos explantes (altura dos explantes), os que se destacaram, foram os tratamentos com baixas ou nenhuma concentração reguladores vegetais no meio de cultura.

FIGURA 6- Crescimento em Altura (cm) das plântulas nos diferentes tratamentos após 40 dias de cultivo *in vitro*.

A aclimação *ex vitro* das plântulas conforme TABELA 5, demonstra claramente um menor índice de sobrevivência das plântulas pré-enraizadas com maior concentração de auxinas, sendo de menor taxa de sobrevivência, os tratamentos N5, com $1,50\text{mg.L}^{-1}$ de NAA e o tratamento N9 com $1,50\text{mg.L}^{-1}$ de IBA. Porém, a baixa ou nenhuma concentração, resultaram nos melhores índices de sobrevivência, destacando-se os

tratamentos onde não se utilizou nenhum regulador vegetal para induzir o enraizamento (tratamento S0).

Este fato foi verificado também por CUZZUOL (1993) em cravo (*Dianthus caryophyllus*), e também por HASEGAWA *et al* (1973) em *Asparagus officinalis* L. sob alta intensidade luminosa.

Diante deste resultado, para a fase de aclimação *in vitro*, utilizou-se somente as plântulas sem os tratamentos com reguladores vegetais.

TABELA5 – Sobrevivência (%) das plântulas aclimatadas *ex vitro* (média de 10 repetições)

Tatamentos	Sobrevivência (%)
S0 – s/ regulador veg.	81 A a
S1 – 0,25mg.L ⁻¹ NAA	69 ABC ab
S2 – 0,50mg.L ⁻¹ NAA	67 ABC ab
S3 – 1,00mg.L ⁻¹ NAA	72 ABC ab
S4 – 1,50mg.L ⁻¹ NAA	62 C ab
S5 – 0,25mg.L ⁻¹ IBA	79 AB ab
S6 – 0,50mg.L ⁻¹ IBA	67 ABC ab
S7 – 1,00mg.L ⁻¹ IBA	63 BC ab
S8 – 1,50mg.L ⁻¹ IBA	60 C b
F (Trats)	3,6064
CV (%)	17,196

Obs.: Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (maiúsculas) e 1% (minúsculas).

Analisando-se a TABELA 6, verifica-se uma certa vantagem na utilização de sombreamento na fase *ex vitro* da aclimação, onde nota-se claramente que os tratamentos com sombrite resultaram em melhores resultados nos parâmetros analisados. Porém, o crescimento em telas, e a testemunha não apresentaram um bom desempenho obtido pelos sombreadores, sendo considerados como pior resultado as plântulas sob a tela verde, este talvez devido a filtragem ou reflexão de luz na faixa de comprimento de onda do verde, na qual é pouco absorvido pelos vegetais.

Observando-se a mesma TABELA 6, verifica-se nitidamente a superioridade na produção de matéria seca das raízes nos tratamentos P4 (sombreadores de 50%) e P5(sombreadores de 80%). HASEGAWA *et al*(1973), também utilizaram na aclimação de *Asparagus officinalis* L., sombreamento de 80% (Saran cloth cover). Os tratamentos P3, P4 e P5 não diferiram estatisticamente em relação ao peso da matéria seca da parte aérea, mas as plântulas aclimatadas *in vitro* após 40 dias, apresentaram sintomas de estiolamento (tratamento P5), com uma coloração verde translúcida e internódios bem mais espaçados quando comparados aos demais. Este fator de estiolamento, deve ser considerado como um fator negativo no plantio destas mudas, em canteiro definitivo.

LAFORGE *et al* (1991) em seu trabalho com *Asparagus officinalis* L., framboesa (*Rubus idaeus* L.) e morango (*Fragaria x anasa* Duch.), obtiveram um grande incremento na matéria seca destes materiais durante a aclimação com alta intensidade de luz e alta concentração de CO₂, mas pequena porcentagem de crescimento na aclimação *in vitro*, com alta intensidade e pequena concentração de CO₂.

Este mesmo resultado foi também obtido por NAVARRO *et al* (1994) com

banana (*Musa AAA* cultivar Petite Naine), os quais obtiveram um incremento acentuado no crescimento de acordo com o fornecimento de alta intensidade luminosa ($240\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), mas juntamente com alta concentração de CO_2 (4%).

A atividade fotossintética em cultura de células cultivadas em meio sintético foram estudadas por YAMADA *et al* (1978) e BARZ & HUSEMANN (1982), onde concluíram que as clorofilas destas células perderam a capacidade de suprirem os carboidratos necessários para o desenvolvimento, células estas portanto, dependentes de uma fonte externa de carboidratos. Uma situação similar, provavelmente exista para plântulas inteiras em fase de aclimação, embora existam poucas informações a respeito (GROUT & ASTON, 1978).

Em plantas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch, cv. Gento) micropropagadas, foi observado que as folhas, produzidas durante a fase *in vitro*, não fixam carbono suficiente para o desenvolvimento da planta sem uma fonte adicional de carbono, sendo essas primeiras folhas, importantes talvez, somente como fonte de reservas de outros nutrientes (GROUT & MILLAN, 1985).

Em geral, a limitada taxa de fotossíntese em plantas em crescimento *in vitro* tem sido atribuída, entre outros fatores, à inadequada troca gasosa nos frascos (FUJIWARA *et al.*, 1987; KOZAI *et al.*, 1987.)

A utilização da modificação da concentração de CO_2 no meio, é uma tecnologia relativamente recente em nossas condições, mas é uma prática que deve ter maior atenção nas pesquisas nessa área.

TABELA 6 – Dados médios do comprimento (cm) e da produção de matéria seca (mg) da raiz e da parte aérea das plântulas aclimatadas sob diversos tratamentos de sombreamento, após 40 dias.

Tratamentos	Comprimento (cm)		Peso da Mat. Seca (mg)	
	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea
P0 – Testemunha	3,34 BC bc	7,82 BC abc	0,042 Bc b	0,31 B b
P1 – Clar. Branco	3,46 BC bc	7,62 BC bc	0,017 BC B	0,32 B b
P2 – Clar. Verde	2,80 C c	6,10 C c	0,011 C d	0,26 B b
P3 – Sombr. 18%	4,14 AB ab	7,80 BC abc	0,020 B ab	0,59 A a
P4 – Sombr. 50%	4,80 A a	8,62 AB ab	0,029 A a	0,56 A a
P5 – Sombr. 80%	4,70 A a	10,18 A a	0,030 A a	0,54 A a
F (Trat.)	13,91	8,55	16,78	26,62
CV (%)	12,42	12,76	21,29	15,34

Obs.: Médias seguidas por letras distintas diferem, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% (maiúsculas) e 1% (minúsculas).

5-CONCLUSÕES

Nas condições em que foi conduzido este trabalho, e através dos dados obtidos, conclui-se que:

1. O melhor tratamento com relação a produção de gemas laterais sem altos índices de vitrificação foi aquele contendo $1,25\text{mg.L}^{-1}$ de BAP com $0,05\text{mg.L}^{-1}$ de NAA em meio MS modificado, seguido do tratamento no qual foi utilizado $1,00\text{mg.L}^{-1}$ de BAP com $0,05\text{mg.L}^{-1}$ de NAA em meio MS modificado.

2. Doses elevadas de citocininas BAP com concentração de $0,05\text{mg.L}^{-1}$ de NAA, resultaram em maior porcentagem de vitrificação, sendo o tratamento que resultou em maior porcentagem, foi aquele contendo $1,50\text{mg.L}^{-1}$ de BAP com $0,05\text{mg.L}^{-1}$ de NAA em meio MS modificado.

3. A concentração de $1,25\text{mg.L}^{-1}$ de NAA foi ineficiente na produção de gemas laterais, bem como no crescimento em altura dos explantes.

4. No enraizamento *in vitro*, as auxinas utilizadas (NAA e IBA) nas concentrações estudadas, se mostraram baixa eficiência quando comparadas ao tratamento sem o uso de reguladores vegetais.

5. O melhor resultado com relação à utilização de sombreamento na aclimação,

foi obtido utilizando-se sombreadores de 50% e 80%, porém o último, apresentando sintomas de estiolamento.

6. O pior resultado obtido na aclimação, foi com a utilização de telas de coloração verde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANON. *Gypsophilla* clean-up. **Grower**, v.90, n.18, 0.869, 1978.

BARROSO, G.M. Família Caryophyllaceae Lindl. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. São Paulo: EDUSP, v.1, p.103-108: 1978.

BARZ, W.; HUSEMANN, W. Aspects of photoautotropic cell suspension cultures. **Plant Tissue Culture**. v.41, p.245-248, 1982.

BETTI, J.A. Obtenção de material propagativo vegetal testado livre de vírus. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M. Ed. **Biotechnologia para produção vegetal**. Piracicaba: FEALQ, 1991. p.145-69.

BOUZA, L.; JACQUES, M.; MINIGIAL, E. *In vivo* propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de Vatry': developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase. **Scientia Horticulturae**, v.58, p.241-51, 1994.

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

BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.H. Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, manitol, ABA, and CO₂. **Journal of Experimental Botany**, v.33, p.338-392, 1982.

CROCOMO, O.J. Plant biotechnology in the agriculture and development in Brasil. In: Simpósio Anual da Academia de Ciência de São Paulo, 11., São Paulo, p.53-71, 1986.

CROCOMO, O.J. Biotecnologia de plantas: Aplicação da engenharia celular. **Biotecnologia**, n.17, p.1-2, 1988.

CUZZUOL, G.R.F. Parâmetros bioquímicos e fisiológicos da vitrificação e do desenvolvimento do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). Piracicaba, 1993. 89p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

DAIMON, H.; MII, M. Plantlet formation from cultured stem segments of *Rhodocarpus macrophyllus*. **Scientia Horticulturae**, v.47, p.323-326, 1991.

DAVIES, M.J.; BAKER, R.; HANAN, J.J. Clonal multiplication of carnation by micropropagation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.102,n.4, p.48-53,1977.

DEBERGH, P.C. Recent trends in the application of tissue culture to ornamentals. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE CULTURE. New York: Alan R.Liss, 1986. v.3, p.389-93.

DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. A scheme for comercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, v.14, p.335-345, 1981.

DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H., Ed. **Micropropagation: technology and application**. Amsterdan: Kluwer Academic, 1991, p.1-3.

DENCSO, I. Factors influencing vitrification of carnation and conifers. **Acta Horticulturae**, v.1, p.152-166, 1984.

EARLE, E.D.; LANGHANS, R.W. Canations propagation from shoot tips cultured in liquid medium. **HortScience**, v.10, n.6, p.608-610, 1975.

ENGVILD, K.C. Callus and cells suspension cultures of carnation. **Physiologia**

Plantarum, v.26, p.62-66, 1972.

FUJIWARA, K.; KOZAI, T.; WATANABE, I. Measurement of carbon dioxide gas concentration in stoppered vessels containing tissue cultured plantlets and estimates of net photosynthetic rates of the plantlets. **Journal of Agricultural Meteorology**, v.43, p.21-30, 1987.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; DEBERGH, P., MAENE, L.; PASQUES, M.; BOXUS, P. Vitricification: morphological, physiological and ecological aspects. In: Bong, J.M.; DURZAN, D.J. Ed. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. New York, 1984, v.1, p.152-166.

GEMTCHUJNICOV, I.D. Família Cariophilaceae Lindl. In: **Manual da taxonomia vegetal**, São Paulo: Ceres, Família Caryophyllaceae Lindl, v.1, p.228-230, 1976.

GROUT, B.W.W.; ASTON, M.J. Transplantating of cauliflower plants regenerated from meristem culture, I. Water loss and water tyransfer related to chamges in leaf wax and to xylem regeneration. **Horticultural Research**, v.17, p.1-7, 1977.

GROUT, B.W.W.; ASTON, M.J. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. II. Carbon dioxide fixation and development of photosynthetic ability. **Horticultural Research**, v.17, p.65-71, 1978.

GROUT, B.W.W.; CRISP, P.C. Practical aspects of the propagation of cauliflower by meristem culture. **Acta Horticulturae**, v.78, p.289-295, 1977.

GROUT, B.W.W.; MILLAN, S. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. **Annals of Botany**, v.55, p.129-131, 1985.

GUKASYAN, I.A.; BUTENKO, R.G.; PETOYAN, S.A.; SEVOST'YANOVA, T.A. Morphogenesis of isolated apices of remontant carnation on an artificial medium. **Soviet Plant Physiology**, v.24, p.130-135, 1977.

HACKETT, W.P.; ANDERSON, J.M. Asept multiplication and maintenance of differentiated carnation shoot tissue derived from shoot apices. **American Society for Horticultural Science**, v.90, p.365-369, 1967.

HASEGAWA, P.H.; MURASHIGE, T.L; TAKATORI, F.H. Propagation of asparagus through shoot apex culture. II. Light temperature requirements, transplantability of plants, and cytohistological characteristics. **Journal for American Society Horticultural Science**, v.98, p.143-148, 1973.

HILL, G.P. Root formation in callus culture of *Gypsophila paniculata* L. **Naturwissenschaften**, v.54, p.522, 1967.

KOZAI, T.; IWANAMI, Y.; FUJIWARA, K. Effects of CO₂ enrichment of the plantlet growth during the multiplication stage. **Plant Tissue Culture Letters**, v.4, p.22-26, 1987a.

KOZAI, T.; HAYASHII, M.; HIROSAWA, Y.; KODAMA, T.; WATANABE, I. Environmental control for acclimatization of *in vitro* cultured plantlets (1) Development of the acclimatization unit for accelerating the plantlet growth and the test cultivation. **Journal of Agronomic Meteorology**, v.212, p.223-229, 1987.

KUSEY, Jr.W.E. ; HAMMER, P.A.; WEILER, T.C. *In vitro* propagation of *Gypsophila paniculata* L. Bristol Fairy. **HortScience**, v.15, p.600-601, 1980.

LAForge, F.;LUSSIER, C; DESJARDINS, Y; GOSSELIN, A. Effecty and CO₂ enrichment during *in vitro* rooting on subsequent growth of plantlets of strawberry, raspberry and asparagus in acclimatization. **Scientia Horticulturae**, v.47, p.259-269, 1991.

LIBANIO ,R.A.; WITMER, A.H.M. Comparação entre plantas de crisântemo propagadas *in vitro* e *in vivo*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 6., Campinas, Ed.Cargil, 1987, p.77.

MARIN, J.A.; GELLA, R.; HERRERO, M. Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. **Annals of BOTany**, v.62, p.663-670, 1988.

MIL, M.; BUTATTI, M.; GIMELI, F. Carnation. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BAJAJ, Y.P.S. Ed. **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1990, v.5, cap.12, p.284-318.

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

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

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

NAVARRO, C.; TEISSON, C.; CÔTE, F.; GANRY, J. Effects of light intensity and CO₂ concentration on growth of banana plants (*Musa* AAA, cultivar 'Petite Naine') *in vitro* and subsequent growth following acclimatization. **Scientia Horticulturae**, v.60, p.41-54, 1994.

- PAQUES, M. Vitrication and micropropagation: causes, remedies and prospects. **Acta Horticulturae**. v.289, p.283-290, 1991.
- PHAN, C.T. Vitreous state *in vitro* culture: ethylene versus cytokinin. **Plant Cell Reports**, v.9, p.517-519, 1991.
- PHILLIPS, D.J.; MATTHEWS, G.J. Growth on development of carnation shoot tips *in vitro*. **Botanical Gazette**, v.125, n.1, p.7-12, 1960.
- SAGAWA, Y.; KUNIZAKI, J.T. Micropropagation of floriculture crops. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BAJAJ, Y.P.S. Ed. **Handbook of plant cell culture: ornamental species**, New York 1990. v.5, cap.3, p.25-6.
- SHORT, K. C.; WARBURTON, J.; ROBERTS, A. V. Hardening of cultured cauliflower and Chrysanthemum plantlets to humidity. **Acta Horticulturae**, v.212, p.329-334, 1987.
- SLUIS, C.J.; WALKER, K.A. Commercialization of plant tissue culture propagation. **IAPCT News**, v.47, p.2-12, 1985.
- SMITH, E. F.; ROBERTS, A. V.; MOTTLEY, J. The preparation *in vitro* of Chrysanthemum for transplantation to soil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.21, p.141-145, 1990.

STONE, O.M. Factors affecting the growth of carnation plants from shoot apices. **Annals of Applied Biology**, v.52, p.119-209, 1963.

STONE, O.M. The elimination of four viruses from carnation and Sweet William by meristem-tip culture. **Annals of Applied Biology**, v.62, p.119-122, 1968.

SUTTER, E.G. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and swweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of the Americam Society for Horticultural Science**, v.113, p.234-238, 1988.

SUTTER, E.G.; LANGHANS, R.W. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tips culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.104, n.4, p.493-496, 1979.

SUTTER, E.; LANGHANS, R.W. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shhot-tip culture. **Canadian Journal of Botany**, v.60, p.2896-2902, 1982.

TAKANE, R.J; MINAMI, K; LUCCHESI, A.A; ALMEIDA, M. Influência do cloreto de cálcio no crescimento de explantes de *Gypsophila paniculata* L. (CARYOPHYLLACEAE), cultivados *in vitro*. **Scientia Agrícola**, v.52, n.2, p.235-239, 1994.

- TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Factors affecting differentiation *in vitro*, and a mass-propagation scheme for *Begonia x hiemalis*. **Science Horticulturae**, v.16, p.65-75, 1982.
- VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* L.Karst. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.3, p.257-264, 1984.
- WARDLE, K.; DOBBS, E. B.; SHORT, K. C. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.108, n.3, p.386-389, 1983.
- WARDLE, K.; QUINLAN, A.; SIMPKINS, I. Absciscic acid and the regulation of water loss in plantlets of *Brassica oleracea* L.var. Botrytis, regenerated through apical meristem culture. **Annals of Botany**, v.45, p.745-752, 1979.
- WHITE, P.R. A handbook of plant tissue culture. Lancaster, Jacques Cattell Press, 1943, p.332-335.
- YAMADA, Y.; SATO, F.; HAGIMORI, M. Photoautotropism in green culture cells. **Frontiers of Plants Tissue Culture**, v.35, p.453-462, 1978.

YANAGIZAWA, S.S. Uma cultura que rende dinheiro. **Informe GEP/DESR-USP/ESALQ**, v.4, n.7, p.15, 1991.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants, In: DEBERG, P.C.; ZIMMERMAN, R.H., Ed. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991, p.45-69.

ZUCHERELLI, G. Moltiplicazione *in vitro* dei portainnesti chonali del pesco. **Frutticoltura**, v.41, p.15-20, 1979.