

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

F475e Figueiredo, Geórgia Soares

Estabelecimento in vitro de marmeleiro japonês (*Chaenomeles sinensis* Koehne) cv Andramig I / Geórgia Soares Figueiredo. - Pelotas, 2009.

82f.

Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Fruticultura de Clima Temperado. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2009, Márcia Wulff Schuch, Orientador.

.
1.Marmelo 2. Micropropagação 3. Meio de cultura 4. Citocinina 5. Qualidade de luz I Schuch, Márcia Wulff (orientador)
II .Título.

CDD 634.13

GEÓRGEA SOARES FIGUEIREDO

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE MARMELEIRO JAPONÊS
(*Chaenomeles sinensis* Koehne) CV ANDRAMIG I**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Fruticultura de Clima Temperado da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dra. Márcia Wulff Schuch

Pelotas – 2009

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Márcia Wulff Schuch
(Departamento de Fitotecnia- FAEM/ UFPel)
(Orientadora/ Presidente da Banca examinadora)

Prof. Dr Clevison Luiz Giacobbo
(Centro de Ciências Agrárias Itaqui- UniPampa)

Prof^a. Dr^a Andréa de Rossi Rufato
(Departamento de Fitotecnia- FAEM/ UFPel)

Prof^o. Dr Carlos Rogério Mauch
(Departamento de Fitotecnia- FAEM/ UFPel)

Dedico

***Aos meus pais Luiz Homero Figueiredo e Vera Lucia Soares Figueiredo e
aos meus avos Antonio Flavio Soares (in memorian) e
Homero Figueiredo (in memorian).***

**“Quero, um dia, dizer as pessoas que nada foi em vão...
Que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades e às pessoas
Que a vida é bela sim e que eu sempre dei o melhor de mim...
E que valeu a pena.”**

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre iluminar meu caminho me dando forças para superar os obstáculos e por tornar possível à realização de mais um sonho.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo exemplo, apoio e incentivo não só nesta etapa, mas no decorrer de toda a minha vida.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, especialmente à Área de Concentração em Fruticultura de Clima Temperado e seus professores pelo conhecimento e oportunidade de realização deste curso.

À professora Márcia Schuch pela orientação, confiança e incentivo a mim dispensados.

A todos os meus familiares que sempre estiveram torcendo por mim, me apoiando e incentivando, em especial as minhas avós Ligia e Delma e a minha madrinha Cleusa por toda a energia, confiança e amor. Ao meu tio Wagner pelo exemplo, a Caroline pela companhia e pelo amor.

Aos meus queridos amigos Poliana, Lorena, Ana Paula, Gisely e Tiago por todos os momentos maravilhosos que passei ao lado de vocês.

Ao meu cachorro Thor, pelo companheirismo nas infinitas horas de leitura, amor incondicional e compreensão.

Aos demais colegas e amigos do curso de Pós-Graduação, pelo convívio e amizade ao longo do tempo.

Aos colegas do Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas Mirian, Éderson, Geniane, Marcelle, Cláudia e Tania pelo auxílio durante a realização deste trabalho.

A minha irmã de coração Nina, aos meus grandes e queridos amigos, Cassiano, Carolina, ao meu afilhado Wilsinho e ao Eduardo, um amigo muito especial, que mesmo de longe estiveram presentes torcendo por mim e por minhas conquistas.

A Tia Lena por ter sido uma segunda mãe para mim nesta etapa, obrigado por tudo, pelo chimarrão, pelas conversas, incentivos, pela mão amiga.

Minha sincera gratidão a todos, que de alguma forma contribuíram para a construção deste trabalho, e que de alguma forma fazem parte da minha vida, pela companhia ao longo da estrada da vida.

RESUMO

O marmeleiro japonês *Chaenomeles sinensis* Koehne pode ser utilizado como porta-enxerto para marmeleiros, pereiras, nespereiras e também como cultivar copa. O uso deste marmeleiro via seminífera, como porta-enxerto para outras espécies e cultivares de marmelo, tem se mostrado viável, o inconveniente na reprodução sexual é a obtenção de plântulas desuniformes, o que não é desejado no estabelecimento de plantios comerciais, devido à segregação gênica. A tecnologia de produção de mudas para o marmeleiro 'Japonês' por propagação vegetativa não está ainda definida, devido a baixa porcentagem de enraizamento, sendo assim a cultura de tecidos apresenta-se como uma alternativa viável na formação de pomares clonais ou produção comercial de mudas. Foram realizados experimentos a fim de determinar um protocolo de estabelecimento *in vitro* desta espécie, onde foi testado o desinfestante a base de cloro adequado a desinfestação do material vegetal, bem como o a citocinina, tipo de vedação dos frascos, concentração salina do meio de cultura, meio de cultura, concentração da citocinina BAP e qualidade de luz. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o desinfestante hipoclorito de cálcio é eficiente na desinfestação dos explantes, e a citocinina BAP promove melhores resultados no estabelecimento, comparada as citocininas 2iP e Zea. Frascos vedados com algodão, ao invés de alumínio, reduzem a oxidação dos explantes e o meio MS na sua concentração salina original promoveu melhor estabelecimento dos explantes. O meio WPM demonstrou resultados superiores ao meio MS e a citocinina BAP na concentração de 1mg.L^{-1} ou 2mg.L^{-1} promove aumento no número e comprimento das brotações, assim como a utilização de luz vermelha quando comparada a luz branca e a luz verde.

Palavras-Chave: Micropropagação. Marmelo. Meio de cultura. Citocinina. Qualidade de luz.

ABSTRACT

The Japanese quince (*Chaenomeles sinensis* Koehne) can be used as rootstocks for quince, pear, loquat trees and as cultivar canopy. The use of quince by seeds, as rootstocks for other quince species and cultivars, has been shown viable. However, the inconvenient in the sexual reproduction is obtaining of not uniform seedlings, since it is not desired in the commercial plantations establishment due gene segregation. The seedlings production technology for Japanese quince by vegetative propagation is not defined, due low percentage of rooting. Thus, the tissue culture presents as a viable alternative in the clonal orchards development or seedlings commercial production. Experiments were performed to determine a protocol of *in vitro* establishment this specie, where was tested the disinfectant with chlorine appropriate for vegetal material, as well as cytokinin, flask cover, salt concentration of culture medium, culture medium, BAP cytokinin concentration and light quality. It could be conclude that calcium hypochlorite disinfectant is effective in the explants disinfestations, and the BAP provides better results in the establishment than 2iP and Zea cytokinins. Sealed flasks with cotton instead aluminum, reduce the explant oxidation and the original salt concentration of MS medium promotes better explant establishment. The WPM medium showed higher results than MS medium and BAP at 1mg.L^{-1} or 2mg.L^{-1} concentration promotes an increase in the number and length of sprouting, as well as the use of red light instead white and green light.

Keywords: Micropropagation. Quince. Culture medium. Cytokinin. Light quality.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Considerações gerais da espécie	13
2.2. Micropropagação	15
3. METODOLOGIA GERAL	22
CAPÍTULO I- Desinfestação e tipo de citocinina no estabelecimento <i>in vitro</i> de marmeleiro Japonês cultivar ANDRAMIG	
Introdução	23
Material e Métodos	25
Resultados e Discussões	28
Conclusões	33
CAPÍTULO II- Concentração salina do meio de cultura e tipo de vedação no estabelecimento <i>in vitro</i> de marmeleiro Japonês cultivar ANDRAMIG	
Introdução	34
Material e Métodos	35
Resultados e Discussões	37
Conclusões	40
CAPÍTULO III- Meio de cultura e concentração da citocinina BAP no estabelecimento <i>in vitro</i> de marmeleiro Japonês cultivar ANDRAMIG I	
Introdução	41
Material e Métodos	42
Resultados e Discussões	44

	12
Conclusões	48
CAPÍTULO IV- Qualidade da luz no estabelecimento in vitro de marmeleiro Japonês cultivar ANDRAMIG I	49
Introdução	49
Material e Métodos	50
Resultados e Discussões	51
Conclusões	52
CONCLUSÕES GERAIS	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICES	66

1. INTRODUÇÃO GERAL

O marmeleiro japonês *Chaenomeles sinensis* Koehne tem origem chinesa, sendo, contudo erroneamente conhecido no Brasil como marmeleiro Japão ou Japonês (RIGITANO, 1957). Este marmeleiro pode ser utilizado como porta-enxerto para marmeleiros, pereiras, nespereiras e também como cultivar copa (ABRAHÃO et al., 1992), possui excelente afinidade com o marmeleiro 'Portugal', também apresenta afinidade com a pereira 'Smith' e nespereira 'Tanaka' (ABRAHÃO et al., 1991).

O marmeleiro Japonês possui como vantagem a grande quantidade de sementes por fruto (aproximadamente 150), cinco vezes mais que os demais marmeleiros do gênero *Cydonia* (em média 40 sementes por fruto) (CAMPO DALL'ORTO, 1982), alta germinação, uniformidade e afinidade com os marmeleiros cultivares copa 'Portugal', 'Provence' e 'Mendoza INTA-7' (ABRAHÃO et al., 1991; 1996). Além disso, essa cultivar possui resistência a requeima ou entomosporiose (*Entomosporium maculatum*), além de alto vigor e produtividade (ABRAHÃO et al., 1992).

O uso do marmeleiro Japonês via seminífera, como porta-enxerto para outras espécies e cultivares de marmelo, tem se mostrado viável, principalmente pelo elevado número de sementes por fruto, elevada germinação das sementes e emergência dos seedlings, resistência ao damping-off, uniformidade na fase de formação dos porta-enxertos e boa afinidade com os cultivares copa de marmeleiro (PIO et al., 2007a; 2007b). No entanto, os estudos até o momento com a utilização do marmeleiro Japonês como porta-enxerto se baseiam no processo de propagação via semente.

O inconveniente na reprodução sexual é a obtenção de plântulas desuniformes, o que não é desejado no estabelecimento de plantios comerciais, devido à segregação gênica (FACHINELLO et al., 2005).

A tecnologia de produção de mudas para o marmeleiro 'Japonês' por propagação vegetativa, em especial pelo processo de estaquia, não está ainda definida, uma vez que os resultados não são animadores, devido a baixa porcentagem de enraizamento (PIO et al., 2005). Sendo assim a cultura de tecidos apresenta-se como uma alternativa viável de clonagem de espécies lenhosas, para a formação de pomares clonais ou produção comercial de mudas (ASSIS; TEXEIRA, 1998).

A micropropagação é uma técnica que permite produzir material em larga escala, em curto espaço de tempo e com valor sanitário superior, em relação ao material obtido por técnicas convencionais como estaquia e mergulhia em cepa (BIANCHI et al., 2003). Segundo Hartmann et al. (2002), existem quatro estágios de desenvolvimento específico na micropropagação: (1) estabelecimento dos explantes *in vitro*, (2) multiplicação *in vitro*, (3) rizogênese e (4) aclimatização.

Para iniciar a micropropagação de uma planta, é necessário estabelecer a cultura *in vitro*, isto é, obter as plantas livres de contaminantes visíveis e suficientemente adaptadas às condições *in vitro* para que, numa fase seguinte, possam ser multiplicadas (SCHUCH; ERIG, 2005). Após o estabelecimento *in vitro* da espécie, livre de contaminantes visíveis e suficientemente adaptadas a estas condições, a etapa que se segue é a de multiplicação, cujo objetivo é a de maximizar o número de gemas.

A etapa seguinte é a rizogênese, cujo propósito é a formação de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas no estágio de multiplicação, que permite a constituição de plantas completas, para posterior aclimatação às condições *ex vitro* (CENTELLAS et al., 1999). A aclimatação é o processo pelo qual as plantas produzidas *in vitro* são transferidas para um ambiente com as condições climáticas naturais. Estas novas condições devem ser passadas às plantas progressivamente, de forma que elas não sofram estresses que possam culminar em danos profundos ou mesmo em sua morte (SILVA et al.,

1995). Esta é, sem dúvida, juntamente com a etapa de enraizamento, uma das mais críticas em todo o processo de micropropagação (FACHINELLO et al., 2005).

Entretanto, a micropropagação é um processo com elevados custos de produção, que em grande parte deve-se às perdas causadas pela contaminação *in vitro*, pelas desordens fisiológicas e morfológicas nas plantas, à baixa percentagem de sobrevivência no estágio de aclimatização às condições *ex vitro*, a necessidade de mão-de-obra, de certa forma especializada, para a intensiva manipulação dos frascos e das plantas (KURATA; KOZAI, 1992; KOZAI; KUBOTA, 2001) e, principalmente, ao elevado custo de funcionamento e manutenção das salas de crescimento com regimes de luz artificial e temperatura controlada, onde as culturas *in vitro* são normalmente incubadas (STANDAERT DE METSENAERE, 1991; KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Considerações gerais sobre a espécie

A fruticultura de clima temperado é uma atividade de grande importância sócio-econômica e representa uma importante fração da produção de frutas no Brasil, estando a maior área localizada na Região Sul do país (ZANETTI, 2002).

Dentre as plantas frutíferas de clima temperado, o marmelo é uma das mais interessantes e apreciadas frutas em todo o mundo, devido ao alto teor de pectina, larga aplicação na industrialização, para a fabricação de marmeladas, compotas e geléias. Introduzido no Brasil em 1532 por Martim Afonso de Souza, os marmelos e a marmelada foram os principais e os primeiros produtos de exportação paulista, antecessora ao café.

No mundo antigo e no Brasil colonial, poucos frutos como o marmelo tiveram tão relevante papel e, atualmente, é difícil encontrar uma frutífera com seu valor histórico-social tão pouco difundida e estudada. As causas prováveis desse pequeno interesse devem residir na utilização pouco nobre do marmelo, somente como matéria-prima industrial e no incipiente consumo ao natural (PIO et al., 2005b).

Há duas décadas, a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e, mais recentemente, o Instituto Agrônômico (IAC) vêm estudando o marmeleiro 'Japonês' (*Chaenomeles sinensis* Koehne). Este marmeleiro destaca-se por possuir produção tardia, conferir excelente marmelada,

principalmente quando misturada sua polpa com a de outro marmeleiro e, por sua rusticidade, principalmente em relação à resistência à entomosporiose (PIO et al., 2005c).

O marmeleiro *Chaenomeles sinensis* tem origem chinesa, sendo, contudo erroneamente conhecido no Brasil como marmeleiro Japão ou Japonês. A planta apresenta um porte peculiar, com ramos de crescimento ereto que se assemelham aos da pereira. Seus frutos são grandes, de 12 a 16 cm de comprimento, oblongos, com ápice semelhante à base, de coloração verde-escura, aparentando uma pêra do tipo SCHIMIDT (RIGITANO, 1957).

Esse marmeleiro, atualmente, vem sendo utilizado como porta-enxerto para os marmeleiros no Brasil, pode também ser uma opção para pereiras e nespereiras (CAMPO DALL'ORTO et al., 1990; ABRAHÃO et al., 1991), porém, pouco se conhece ainda sobre os ganhos produtivos com a utilização desse porta-enxerto. Possui elevado número de sementes por frutos (acima de 180), alta germinação e emergência (acima de 90% e 70%, respectivamente), e boa afinidade na relação enxerto/porta-enxerto (ABRAHÃO et al., 1995; PIO et al., 2005b; ENTELMANN et al., 2006).

A utilização de um porta-enxerto é recomendada quando as condições de solo são adversas ao desenvolvimento radicular da variedade copa. Essas adversidades podem ser de ordem física, tais como solos de baixa fertilidade, muito úmidos, com alto teor em calcário ativo, ou biológica, tais como fungos e pragas. Na escolha da cultivar a ser utilizada como porta-enxerto, devem ser considerados, entre outros fatores, as condições locais de clima, solo, presença de pragas e doenças, além da adequada compatibilidade entre a variedade copa e o porta-enxerto (OJIMA, et al, 1978).

A utilização de mudas enxertadas uniformiza o crescimento de plantas e antecipa o início da produção. Diferentes combinações de porta-enxertos e copa resultam em alterações fisiológicas nas mudas, tais como as relações hídricas e trocas gasosas (CASTLE et al., 1989) que podem originar melhores adaptações a diferentes condições ambientais.

Trabalhos realizados no sentido de definir um protocolo de propagação para o marmeleiro 'Japonês', envolvendo a propagação vegetativa, não

mostraram resultados satisfatórios, devido à baixa percentagem de enraizamento de suas estacas (PIO et al., 2004). Quanto à propagação seminífera, verificou-se que possui elevada germinação de suas sementes, boa afinidade com as principais cultivares-copa do gênero *Cydonia* e vem proporcionando bom desempenho no campo como porta-enxerto (ABRAHÃO et al., 1995; 1996). No entanto, faltam informações no que se refere à emergência das plântulas, desenvolvimento no viveiro e ainda ao tempo de crescimento do porta-enxerto até atingir o ponto da enxertia.

De acordo com Pio (2007) seria interessante comparar essa cultivar de marmeleiro com os demais marmeleiros utilizados comercialmente no Brasil, principalmente na produção de porta-enxertos, para assim verificar as reais potencialidades do marmeleiro 'Japonês', uma vez que se trata de gênero diferente dos demais.

A reprodução sexual apresenta como inconveniente a obtenção de plântulas desuniformes, o que não é desejado no estabelecimento de plantios comerciais, devido à segregação gênica (FACHINELLO et al., 2005).

Neste contexto a micropropagação surge com uma alternativa viável de propagação vegetativa e atualmente vem sendo recomendada para algumas espécies frutíferas e utilizada com sucesso técnico e econômico, principalmente pela rapidez, eficiência de produção e qualidade genética sanitária do material multiplicado (DAMIANO; PALOMBI, 2000).

2.2. Micropropagação

Segundo Souza et al. (2008) o cultivo *in vitro*, por meio da micropropagação, é um método viável de propagação podendo assegurar a uniformidade dos pomares, além de possibilitar a produção de mudas com alta sanidade e acelerar os métodos de propagação convencional, por meio do rejuvenescimento *in vitro*. Villa Lobo e Thorpe (1991) citam a micropropagação como sendo uma importante estratégia para o melhoramento, clonagem e

multiplicação de plantas em larga escala, além de possibilitar plantas livres de vírus e com alta qualidade fitossanitária e genética.

A técnica de cultura de tecidos esta baseada na totipotência das células, ou seja, a capacidade de uma única célula originar um novo indivíduo. A capacidade das células e dos tecidos vegetais é determinada por rotas morfogénéticas e metabólicas específicas, de modo que, por um processo ordenado, formam órgãos e regeneram uma planta (HENSHAW et al., 1982). A predisposição dos tecidos a morfogênese depende da natureza do tecido, do tratamento recebido e do seu estado vegetativo.

Segundo Hartmann et al. (2002), existem quatro estágios de desenvolvimento específico na micropropagação: (1) estabelecimento dos explantes *in vitro*, (2) multiplicação *in vitro*, (3) rizogênese e (4) aclimatização.

Para iniciar a micropropagação de uma frutífera, é necessário estabelecer a cultura *in vitro*, isto é, obter as plantas livres de contaminantes visíveis e suficientemente adaptadas às condições *in vitro* para que, numa fase seguinte, possam ser multiplicadas (SCHUCH; ERIG, 2005).

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) o estado fisiológico da planta matriz tem grande influência no posterior comportamento das culturas. Deve ser levado em conta o estado nutricional da planta, pois plantas bem nutridas fornecem bons explantes. A retirada de explante deve ser feita de preferência a partir de brotações mais novas que são formadas durante a fase ativa de crescimento da planta onde o tamanho do explante também determina suas possibilidades de sobrevivência e capacidade de crescimento.

De modo geral, a micropropagação das espécies lenhosas é mais difícil quando comparada à das espécies herbáceas, devido à perda da capacidade morfogénética de seus tecidos (TORRES; CALDAS, 1990). O estabelecimento *in vitro*, principalmente no caso de espécies lenhosas, como a maioria das plantas frutíferas, apresenta dois sérios problemas: a contaminação e a oxidação dos explantes. Um tratamento que pode ser dado à planta matriz é o estiolamento dos ramos, pois as plantas lenhosas, sendo mantidas à plena luz, estariam sintetizando maior quantidade de fenóis, os quais intoxicam os explantes ao se oxidarem *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A desinfestação de segmentos nodais em espécies lenhosas é a primeira etapa a ser considerada para a realização de ótimo estabelecimento *in vitro* (PIERIK, 1990). Os níveis de contaminação tendem a ser maiores quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo. No entanto, mesmo as plantas submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação são fontes potenciais de microorganismos, que podem tornar-se limitantes aos procedimentos de cultivo *in vitro* (MEDEIROS, 1999). Vesco e Guerra (1999) observaram no estabelecimento *in vitro* de goiabeira serrana, que existe uma forte relação entre a procedência do material e a ocorrência de altas taxa de contaminações, sendo que os explantes provenientes de plantas mantidas a campo apresentaram maiores taxas de contaminações e oxidação.

Segundo Montarroyos (2000), os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar no meio de cultura substâncias tóxicas às plantas. A utilização de diferentes agentes germicidas é fundamental para a redução da contaminação dos explantes na fase de estabelecimento, além disso, as concentrações dos desinfestantes e a combinação dos princípios ativos variam em função da sensibilidade do tecido (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998). Segundo Silva (2005) as substâncias mais utilizadas no processo de desinfestação são o etanol e os compostos a base de cloro, tais como hipoclorito de sódio e de cálcio.

O etanol geralmente é utilizado na concentração de 70% e 80%, acima dessa concentração é menos eficiente e pode desidratar rapidamente os tecidos. Além da ação germicida, o etanol é surfactante, por isso quando aplicado inicialmente facilita a ação de outros produtos. O cloro é o princípio ativo mais utilizado, em geral na forma de hipoclorito de sódio, sendo encontrado facilmente em formulações comerciais, já o hipoclorito de cálcio é encontrado em pó e precisa ser dissolvido, apresenta como vantagem ser menos tóxico para os tecidos do que o sódio (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998).

Garcia et al. (2008) obtiveram melhores resultados com hipoclorito de sódio, quando comparado ao hipoclorito de cálcio na desinfestação de

segmentos nodais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess), Chaves et al. (2004) obtiveram resultados semelhantes na desinfestação de explantes de *Prunus* cv. Mr.S.2/5. De acordo com Trueman (1971) apud Teixeira, (1996) a ação bactericida das soluções de hipoclorito é devido a sua alta capacidade oxidante, que destrói a atividade das proteínas celulares.

A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado ou senescente (GEORGE; SHERRINGTON, 1984). Rodrigues et al. (2003) afirmam que os diferentes tipos de fenóis presentes nos tecidos, ao entrarem em contato com o oxigênio sofrem reações de oxidação, cujos produtos são tóxicos, causando escurecimento e necrose do tecido vegetal. Esses compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases produzindo substâncias tóxicas e inibindo o crescimento dos explantes (GUERRA, 1989). Em espinheira-santa, a redução em 50% da concentração de sais do meio base MS diminuiu a oxidação fenólica (FLORES et al., 1998).

Alguns agentes redutores também podem ser utilizados no meio de cultura, servindo como substrato para enzimas oxidativas, tais como os ácidos cítrico e ascórbico, diminuindo a produção de substâncias tóxicas para as plantas (RIBAS; ZANETTE, 1992). A retirada do ferro do meio de cultura também pode diminuir a oxidação, pois este é cofator de grande número de enzimas oxidativas, a redução da luminosidade na câmara de fluxo laminar, durante a excisão dos explantes e a manutenção da cultura no escuro no início do cultivo também são consideradas benéficas, pois a luz induz à produção de fenóis na planta (MARKS; SIMPSON, 1990).

O crescimento e o desenvolvimento *in vitro* de uma planta são determinados por uma série de fatores complexos: constituição genética, presença de nutrientes (macro e micronutrientes e açúcar), fatores físicos que influenciam o crescimento (luz, temperatura, pH e concentrações de O₂ e CO₂) e, por fim, adição de algumas substâncias orgânicas (reguladores de crescimento, vitaminas, etc.) (TORRES; CALDAS, 1990).

Os meios nutritivos fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in*

vitro. Os meios baseiam-se nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas *in vitro*. Entre os meios de cultura utilizados no processo, o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é o mais usado, formulações especiais, como o meio WPM - Wood Plant Media (LLOYD; MCCOWN, 1980), surgem como alternativas ao meio MS, atendendo melhor, em alguns casos, as exigências de espécies lenhosas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1989). Meios de cultura não adequados podem causar sintomas de deficiência mineral e até a morte dos propágulos (MONTEIRO et al., 2000).

A composição dos meios básicos pode sofrer modificações visando atender as necessidades nutricionais para cada fase da micropropagação. É freqüente a utilização do mesmo meio básico para a fase de isolamento constituído de macro e micronutrientes, vitaminas, inositol, fonte de açúcar e outros compostos, como os reguladores de crescimento.

Embora o meio MS e suas modificações apresentem bons resultados para inúmeras espécies, no caso de espécies lenhosas a sua utilização nem sempre se mostra satisfatória, a utilização do meio WPM é mais eficiente para estas espécies, e isto, não é nenhuma surpresa, pois foi elaborado para plantas lenhosas em geral, este meio apresenta uma composição salina diferente em relação ao meio MS, apresenta também maior disponibilidade da vitamina Tiamina- HCl, a fonte de nitrogênio Nitrato de amônio (NH_4NO_3) e o Nitrato de potássio (KNO_3), afeta o balanço dos íons nitrato e amônio.

De acordo com George (1993) a escolha do meio de cultura a ser utilizado deve-se levar em conta se este é adequado a espécie e ao tipo de cultura a ser estudada. Quando se inicia o processo de micropropagação de uma nova espécie é sensato utilizar os meios de cultura e os métodos realizados com sucesso em outras pesquisas, sendo as mudanças e os ajustes feitos a tentativa de melhorar o crescimento, a morfogênese ou a taxa de multiplicação.

O microambiente dentro dos frascos de cultura parece ser um ambiente homogêneo, mas também é responsável pela variabilidade na resposta ao cultivo *in vitro* das diferentes culturas, os tipos de frasco, tipo de tampa e quantidade de meio presente são fatores determinantes para a qualidade do

microambiente. Em laboratórios comerciais as tampas plásticas de pressão ou de rosca são as mais comumente utilizadas, essas tampas são feitas de polipropileno que resiste a autoclavagem e são reutilizáveis. Outra alternativa é o uso do papel alumínio, e tampas de gaze com algodão, mas são inviáveis em grande escala, por não serem reutilizadas (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998).

A forma de vedação empregada interfere nas trocas gasosas entre o microambiente dentro do frasco e o ar atmosférico, tampas que vedam totalmente os frascos podem ser boas para maior prevenção de contaminação, mas não permitem trocas gasosas adequadas, promovendo o aumento da concentração de CO₂ e etileno dentro dos frascos (FILHO et al., 2002). Em trabalho realizado por Bandeira et al., (2007) o sistema de cultivo *in vitro* mais adequado para multiplicação de *Thymus vulgaris*, tanto do desenvolvimento da parte aérea quanto do sistema radicular, foi em frascos vedados com algodão.

De acordo com Grattaplagia e Machado (1998), a utilização de polivinilcloreto (PVC) é uma prática comum na vedação de frascos, uma das vantagens da sua utilização é que este permite a maior penetração de luz em comparação com outros tipos de tampa. O meio de cultura tende a perder água mais rapidamente quando tampado com tampas plásticas, a menor disponibilidade de água na fase gasosa do frasco pode evitar a vitrificação das culturas e estimular a transpiração, mas a evaporação da água do meio pode causar toxidez as plantas se os ciclos de repicagem não forem encurtados.

Os reguladores de crescimento quando em concentrações específicas, no meio de cultura, desempenham papel fundamental no crescimento e morfogênese dos tecidos (PIERIK, 1990; FLORES et al., 1998). Na fase de estabelecimento *in vitro* o grupo de reguladores de crescimento mais importante são as citocininas, e a utilização deste tem como objetivo suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos nos explantes, que se encontram isolados das regiões produtoras da planta-matriz. As citocininas estimulam a divisão celular, bem como, a indução e a proliferação de brotações adventícias.

Uma das principais funções da citocinina na cultura de tecidos é a indução de gemas adventícias, a proliferação de gemas axilares através da supressão

da dominância apical, também é requerida na formação de calos e outros processos que envolvem a divisão celular. As citocininas comumente usadas são a 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN), thidiazuron (TDZ), 2-isopentenil difosfato (2iP) e zeatina (Zea) (BONGA; VON ADERKAS, 1992).

Segundo Grattapaglia e Machado (1998) a adição de citocininas no meio de cultivo na fase de estabelecimento é indispensável para auxiliar a superação da dominância apical e indução de gemas axilares. Silva (2006) testou as citocininas 2-isopentenil fosfato (2iP) e zeatina estabelecimento *in vitro* de mirtilo cv. Delite e obtiveram melhores resultados com uso de zeatina.

A luz é um fator fundamental para as plantas, pela ação direta ou indireta na regulação de seu crescimento e desenvolvimento, as respostas da planta não dependem apenas de ausência ou presença de luz, mas também da variação em qualidade luminosa (MORINI; MULEO, 2003; FELIPPE, 1986). A qualidade da luz pode estimular o alongamento do caule e das folhas e estimular o enraizamento, a maior ou menor fixação de carbono depende da eficiência da luz, contribuindo na captura de carbono como uma fonte suplementar de carboidratos (ROBIN et al., 1994; ROSSI et al., 1993).

Segundo Morini e Muleo (2003), as plantas desenvolveram uma série de fotorreceptores, para otimizar a captação de energia luminosa para a fotossíntese, que regulam seu crescimento e desenvolvimento em relação a presença, quantidade, direção, duração e qualidade da radiação luminosa incidente.

A fonte de luz, geralmente, utilizada nas salas de crescimento é a lâmpada fluorescente branca-fria. Poucos estudos tem sido realizados buscando compreender o efeito da luz no crescimento e desenvolvimento dos tecidos das espécies lenhosas cultivadas *in vitro* (ERIG; SCHUCH, 2005).

3. METODOLOGIA GERAL

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), em Pelotas, RS.

A espécie estudada foi o marmeleiro Japonês (*Chaenomeles sinensis* Koehne) cv. ANDRAMIG I. As plantas matrizes foram cedidas pela EPAMIG, e mantidas em casa de vegetação.

O trabalho foi dividido em quatro experimentos visando à obtenção de um protocolo adequado para o estabelecimento *in vitro* da espécie. Nos experimentos foram testados: o tipo de desinfestante a base de cloro, a concentração de citocinina, meio de cultura e concentração salina do meio e tipo de luz adequado ao estabelecimento *in vitro*.

CAPITULO I

Desinfestação e tipo de citocinina no estabelecimento *in vitro* de marmeleiro Japonês cultivar ANDRAMIG I

INTRODUÇÃO

O marmeleiro japonês (*Chaenomeles sinensis*) tem origem chinesa sendo, contudo erroneamente conhecido no Brasil como marmeleiro Japão ou Japonês (RIGITANO, 1957). O marmeleiro japonês pode ser utilizado como porta-enxerto para marmeleiros, pereiras, nespereiras e também como cultivar copa (ABRAHÃO et al., 1992), possui excelente afinidade com o marmeleiro 'Portugal', também apresenta afinidade com a pereira 'Smith' e nespereira 'Tanaka' (ABRAHÃO et al., 1991).

Este marmeleiro possui como vantagem a grande quantidade de sementes por fruto (aproximadamente 150), cinco vezes mais que os demais marmeleiros do gênero *Cydonia* (em média 40 sementes por fruto) (CAMPO DALL'ORTO, 1982), alta germinação, uniformidade e afinidade com os marmeleiros cultivares copa 'Portugal', 'Provence' e 'Mendoza INTA-7' (ABRAHÃO et al., 1991; 1996). Além disso, essa cultivar possui resistência a requeima ou entomosporiose (*Entomosporium maculatum*), além de alto vigor e produtividade (ABRAHÃO et al., 1992).

A utilização deste marmeleiro via semínífera, como porta-enxerto para outras espécies e cultivares de marmelo, tem se mostrado viável, principalmente pelo elevado número de sementes por fruto, elevada germinação das sementes e emergência dos seedlings, resistência ao damping-off, uniformidade na fase de formação dos porta-enxertos e boa afinidade com os cultivares copa de marmeleiro (PIO et al., 2007a; 2007b). No entanto, os estudos até o momento com a utilização do marmeleiro Japonês como porta-enxerto se baseia nos processos de propagação via semente.

O inconveniente na reprodução sexual é a obtenção de plântulas desuniformes, o que não é desejado no estabelecimento de plantios comerciais, devido à segregação gênica (FACHINELLO et al., 2005). A tecnologia de produção de mudas para o marmeleiro 'Japonês' por propagação vegetativa, em especial pelo processo de estaquia, não está ainda definida (PIO et al., 2005). Sendo assim a cultura de tecidos tem se apresentado como uma alternativa viável de clonagem de espécies lenhosas, para a formação de pomares clonais ou produção comercial de mudas (ASSIS; TEXEIRA, 1998).

O cultivo *in vitro* é um método viável para propagação de diversas espécies frutíferas, no entanto, um dos maiores entraves no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas, está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminação por fungos e bactérias (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O uso de diferentes agentes germicidas é fundamental para a redução da contaminação dos explantes durante o estabelecimento *in vitro* (CHAVES et al., 2004). A técnica de cultura *in vitro* é de fundamental importância na propagação de forma rápida, podendo auxiliar na eliminação de patógenos, obtendo assim matrizes com qualidade genética e sanitária.

Para iniciar a micropropagação de uma espécie, é necessário estabelecer a cultura *in vitro*, isto é, obter as plantas livres de contaminantes visíveis e suficientemente adaptadas às condições *in vitro* para que, numa fase seguinte, possam ser multiplicadas (SCHUCH; ERIG, 2005). É necessário otimizar as condições de cultura para cada espécie, contudo vários fatores interferem no sucesso de obtenção de um protocolo. Dentre os fatores que mais influenciam para a maximização do potencial genotípico na multiplicação *in vitro*, estão os reguladores de crescimento, que adicionados ao meio de cultura em condições

específicas desempenham papel fundamental. Dentre os reguladores de crescimento as citocininas formam um grupo muito importante e tem como objetivo na fase de estabelecimento suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos (LEONTIEV-ORLOV et al., 2000a; 2000b; PÉREZ-TORNERO et al., 2000).

Visando a obtenção de um protocolo de desinfestação e estabelecimento *in vitro* de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I, este trabalho teve como objetivo estabelecer o desinfestante a base de hipoclorito e a citocinina adequados na desinfestação e estabelecimento desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em dois experimentos realizados no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas, Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas-RS.

Experimento I: Desinfestação de explantes de marmeleiro japonês para início da micropropagação

Foram utilizados segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento, obtidos de plantas matrizes de marmeleiro japonês, cultivar ANDRAMIG I, mantidas em casa de vegetação, as plantas não receberam nenhum tratamento prévio ao estabelecimento. As plantas foram levadas para o laboratório onde foram retiradas as folhas na altura do pecíolo, em câmara de fluxo laminar. Os ramos foram imersos em álcool 70% por 10 segundos, seguidos pela imersão em desinfestantes a base de cloro, hipoclorito de sódio ou hipoclorito de cálcio (conforme o tratamento) na concentração de 2,5% do princípio ativo, adicionado de uma gota de Tween 20, durante 10 minutos. Após a desinfestação o material foi lavado em água estéril por três vezes para

posterior retirada dos explantes (segmentos nodais) sendo colocados individualmente em tubos de ensaio com 5 ml de meio de cultura.

O meio de cultura utilizado foi composto pelos sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) adicionados de 100 mg.L⁻¹ mio-inositol, 30 g.L⁻¹ sacarose, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 7,0 g.L⁻¹ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento na condição de escuro por sete dias (temperatura de 25 ± 2°C) sendo então transferidos para condições de intensidade de luminosa de 27 µmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C.

Os tratamentos constituíram de dois desinfestantes (hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, onde cada repetição constituiu-se de dez tubos, com um explante cada. Aos 45 dias de cultivo foram avaliadas as variáveis percentagem de contaminação bacteriana, percentagem de contaminação fúngica, percentagem de explantes oxidados, percentagem de sobrevivência (indicada pela coloração verde do explante) e percentagem de estabelecimento dos explantes (indicada pelo desenvolvimento de primórdios foliares).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan (α=0,05), através do uso do programa estatístico WINSTAT (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002). Os dados números de folhas e número de brotações foram transformados em $\sqrt{x} + 0,5$, onde x é o valor obtido. Os dados de percentagem foram transformados em arco seno de x/100, onde x é o percentual obtido.

Experimento II: Tipo de citocinina no estabelecimento *in vitro* de marmeleiro japonês

Foram utilizados segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento, obtidos de plantas matrizes de marmeleiro japonês, cultivar

ANDRAMIG I, mantidas em casa de vegetação, as plantas não receberam nenhum tratamento prévio ao estabelecimento. As plantas foram levadas para o laboratório onde foram retiradas as folhas na altura do pecíolo, em câmara de fluxo laminar. Os ramos foram imersos em álcool 70% por 10 segundos, seguidos pela imersão em hipoclorito de cálcio na concentração de 2,5%, adicionado de uma gota de Tween 20, durante 10 minutos. Após a desinfestação o material foi lavado em água estéril por três vezes para posterior retirada dos explantes (segmentos nodais) sendo colocados individualmente em tubos de ensaio com 5 ml de meio de cultura.

O meio de cultura utilizado foi composto pelos sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) adicionados de 100 mg.L^{-1} mio-inositol, 30 g.L^{-1} sacarose, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento na condição de escuro por sete dias (temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) sendo então transferidos para condições de intensidade de luminosa de $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Os tratamentos constituíram de três diferentes citocininas: 6-benzilaminopurina (BAP), 2-isopentenil difosfato (2iP) e zeatina (Zea). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, onde cada repetição constituiu-se de dez tubos, com um explante cada. Aos 45 dias de cultivo foram avaliadas as variáveis, percentagem de estabelecimento dos explantes (indicada pelo desenvolvimento de primórdios foliares), número médio de brotações, comprimento médio das brotações e número médio de folhas.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan ($\alpha=0,05$), através do uso do programa estatístico WINSTAT (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002). Os dados números de folhas e número de brotações foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, onde x é o valor obtido. Os dados de percentagem foram transformados em arco seno de $x/100$, onde x é o percentual obtido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: Desinfestação de explantes de marmeleiro japonês para início da micropropagação

Através da análise de variância pode-se observar que houve diferença significativa para as variáveis analisadas.

A variável percentagem de contaminação bacteriana apresentou diferença para o tipo de desinfestante utilizado (Tabela 1A), sendo que os explantes desinfestados com hipoclorito de sódio apresentaram altos índices de contaminação comparados aos explantes desinfestados com hipoclorito de cálcio (Tabela 1). Na mesma tabela é possível observar que a variável percentagem de contaminação fúngica, também diferiu para os tratamentos utilizados (Tabela 2A), no entanto para esta variável o tratamento onde o desinfestante hipoclorito de cálcio foi utilizado apresentou maior percentagem de contaminação. A percentagem de contaminação fúngica foi baixa para todos os tratamentos, quando comparada as altas taxas de contaminação bacteriana.

Tabela 1. Média da percentagem de contaminação bacteriana e percentagem de contaminação fúngica no estabelecimento *in vitro* de marmeleiro Japonês, cv. ANDRAMIG I. UFPel, Pelotas/ RS, 2009.

	Contaminação bacteriana
Hipoclorito de sódio	69 a
Hipoclorito de cálcio	4.6 b
	Contaminação fúngica
Hipoclorito de sódio	1.2 b
Hipoclorito de cálcio	4.9 a

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

A alta percentagem de contaminação bacteriana pode ser devido à presença de bactérias endógenas presentes na planta-matriz. De acordo com

Grattapaglia e Machado (1998) as contaminações bacterianas endógenas frequentemente representam sério problema no estabelecimento das culturas, pois diversos microorganismos dessa natureza não são expostos aos agentes desinfestantes.

De acordo com Erig e Schuch (2003) as plantas lenhosas, onde se inclui a maioria das plantas frutíferas, apresentam dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, devido principalmente à contaminação e oxidação.

Garcia et al. (2008), testando os desinfestantes hipoclorito de sódio e de cálcio, no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess), observaram menores taxas de contaminação quando utilizaram hipoclorito de sódio, resultado semelhante foi observado em trabalho realizado por Chaves et al., (2002) que obtiveram menores taxas de contaminação utilizando hipoclorito de sódio na desinfestação de explantes de *PRUNUS* cv. Mr.S.2/5.

Para a variável percentagem de oxidação houve diferença entre os tratamentos (Tabela 3A), o tratamento onde se utilizou o desinfestante hipoclorito de cálcio apresentou maior percentagem de explantes oxidados (Tabela 2). Garcia et al. (2008), obtiveram resultados semelhantes em trabalho realizado no estabelecimento *in vitro* de explantes de uvaia (*E. pyriformis*). Erig et al. (2003a, 2003b) testando os mesmos desinfestantes no estabelecimento *in vitro* de macieira cv GALAXY e em mirtilheiro (*Vaccinium ashei* Reade), observaram percentagens de oxidação mais elevadas quando utilizaram o desinfestante hipoclorito de sódio.

Tabela 2. Médias de percentagem de oxidação no estabelecimento *in vitro* de marmeleiro Japonês, cultivar ANDRAMIG I. UFPel, Pelotas/ RS, 2009.

	Percentagem de oxidação
Hipoclorito de sódio	2.9 b
Hipoclorito de cálcio	16 a

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan (P<0,05).

As variáveis percentagem de sobrevivência e percentagem de estabelecimento apresentaram diferença para os tratamentos (Tabela 4A, 5A) e os resultados das duas variáveis foram iguais, ou seja, todos os explantes sobreviventes se estabeleceram. Os explantes desinfestados com hipoclorito de cálcio apresentaram maior percentagem de estabelecimento, quando comparado com os explantes desinfestados com hipoclorito de sódio (Tabela 3). Essa baixa percentagem de estabelecimento pode ter ocorrido em função da elevada taxa de contaminação que o hipoclorito de sódio apresentou.

Tabela 3. Médias de percentagem estabelecimento de explantes de marmeleiro Japonês, cultivar ANDRAMIG I. UFPel, Pelotas/ RS, 2009.

	Percentagem de estabelecimento
Hipoclorito de sódio	4 b
Hipoclorito de cálcio	32 a

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Experimento II: Tipo de citocinina no estabelecimento *in vitro* de marmeleiro japonês

Através da análise de variância foi possível verificar diferença entre os tratamentos para todas as variáveis avaliadas.

A variável percentagem de estabelecimento (Tabela 6A) apresentou média superior quando foi utilizado a citocinina BAP diferindo das citocininas 2iP e Zea, sendo que essas não diferiram entre si (Tabela 4).

Em trabalho realizado por Debnath e McRae (2001), foi constatado que o uso do regulador 2iP na concentração de 25 μm , resultou em uma alta taxa de mortalidade no estabelecimento *in vitro* de explantes de *Vaccinium macrocarpon* Ait., de acordo com os autores, com o 2iP em concentrações mais baixas, obteve-se melhor produção de brotações, o que vem a confirmar o efeito fitotóxico deste regulador em altas dosagens. Grattapaglia e Machado (1998) indicaram que a maior eficiência do BAP em relação às citocininas

cinetina e 2iP pode estar na capacidade dos tecidos vegetais metabolizarem os reguladores de crescimento naturais mais rapidamente do que reguladores de crescimento sintéticos podendo variar em função da espécie da planta utilizada.

Tabela 4. Médias de percentagem de estabelecimento de explantes de marmeleiro Japonês cultivar ANDRAMIG I. UFPel, Pelotas/RS, 2009.

	Percentagem de estabelecimento
BAP	33 a
2iP	18 b
Zea	18 b

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Independente do tratamento utilizado muitos explantes apresentaram formação de calo na gema, que já estava em desenvolvimento, o que acabou impedindo o estabelecimento de muitos explantes. Mesmo em explantes estabelecidos, que já apresentavam folhas desenvolvidas foi possível observar oxidação na base dos explantes (Figura1). Vários fatores podem ter favorecido a formação de calos e posterior oxidação destes, como: alta taxa de umidade dentro dos frascos, fitotoxidade causada pela utilização de citocinina no meio de cultura ou pela sua concentração, a utilização dos desinfestantes à base de cloro, meio de cultura inadequado para o cultivo da espécie.



Figura 1. Explante estabelecido de marmeleiro japonês cv ANDRAMIG I, apresentando oxidação na base das brotações.

Para as variáveis número de brotações e comprimento das brotações (cm) (Tabela 7A, 8A) o tratamento que utilizou a citocinina BAP foi superior aos que utilizaram as citocininas 2iP e Zea, sendo que estas não diferiram entre si (Tabela 5). Ao contrário do observado neste trabalho Leitzke et al. (2007) obteve maiores médias de comprimento das brotações de framboeseira cv 'Heritage' utilizando a citocinina 2iP. Quanto ao número de brotações Souza et al. (2008) observaram melhores resultados em pitangueira quando utilizaram a citocinina BAP comparado com as citocininas Zea e 2iP. A multiplicidade de brotações é característica da BAP, que induz a formação de grande número de brotações e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação (MARTINELLI, 1985).

Tabela 5. Número médio de brotações e comprimento médio das brotações (cm) no estabelecimento *in vitro* de marmeleiro Japonês cultivar ANDRAMIG I. UFPel, Pelotas/ RS, 2009.

	Número médio de brotações
BAP	2.3 a
2iP	1.1 b
Zea	1.0 b
	Comprimento médio das brotações (cm)
BAP	0.69 a
2iP	0.39 b
Zea	0.34 b

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Para a variável número de folhas (Tabela 9A) os tratamentos que utilizaram a citocinina BAP apresentaram médias superiores, não diferindo do tratamento que utilizou a citocinina 2iP, quando se utilizou a citocinina zeatina foram observadas as médias mais baixas, sendo que esta não diferiu do tratamento com 2iP (Tabela 6). Leitzke et al. (2007) observaram que o número de folhas da amoreira-preta cultivar Xavante é estimulado pelo aumento da concentração de BAP até a concentração de 13,3 μm no meio MS.

Tabela 6. Número médio de folhas no estabelecimento *in vitro* de marmeleiro Japonês, cultivar ANDRAMIG I. UFPel, Pelotas/ RS, 2009.

	Número médio de folhas
BAP	27 a
2iP	15 ab
Zea	7 b

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

CONCLUSÕES

Experimento I: Desinfestação de explantes de marmeleiro japonês para início da micropropagação

O desinfestante hipoclorito de cálcio proporciona baixas taxas de contaminação bacteriana e fúngica na desinfestação de explantes.

Experimento II: Tipo de citocinina no estabelecimento *in vitro* de marmeleiro japonês

A citocinina BAP promove aumento no número de brotações e proporciona um maior alongamento destas.

O maior número de folhas é obtido com a utilização da citocinina BAP, sendo que esta não difere da citocinina 2iP.

CAPITULO II

Concentração salina do meio de cultura e tipo de vedação no estabelecimento in vitro de marmeleiro Japonês cultivar ANDRAMIG I

INTRODUÇÃO

O marmeleiro japonês cv ANDRAMIG I surgiu como uma nova opção de porta-enxerto para marmeleiros do gênero *Cydonia*, nespereiras e pereiras. Estudos de propagação vegetativa com esta espécie não têm apresentado bons resultados devido à baixa percentagem de enraizamento demonstrado. Apesar das sementes demonstrarem alto potencial germinativo, as mudas geradas a partir delas apresentam alto grau de variabilidade genética, o que não é desejado em pomares comerciais. Neste sentido a micropropagação surge como uma alternativa que possibilita a produção de mudas com alta qualidade genética e sanitária.

Na cultura de tecidos, normalmente os recipientes utilizados apresentam fechamento semi-hermético, que impede a entrada de microorganismos e reduz o dessecamento do meio de cultivo. Entretanto, este fechamento semi-hermético limita as trocas gasosas e resulta em aumento na umidade relativa, até próximo à saturação, e acúmulo de gases produzidos pela planta, como etileno, etano e CO₂. (DEBERGH, 1988).

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), o microambiente criado dentro dos frascos de cultura parece ser um ambiente homogêneo, mas é

responsável pela variabilidade no comportamento das culturas, uma vez que os fatores determinantes para a qualidade do microambiente são os tipos de frasco, tipo de tampa e quantidade de meio presente. Nos laboratórios a forma de vedação comumente utilizada, onde os frascos são hermeticamente fechados, interfere nas trocas gasosas entre o microambiente dentro do frasco e o ar atmosférico, ocasionando alta umidade relativa do ar, o aumento da concentração de etileno, baixa concentração de CO₂. O etileno é um gás produzido pelos vegetais e pode influenciar no desenvolvimento das culturas *in vitro*.

O tipo de tampa utilizado no frasco é um fator que irá determinar a qualidade do microambiente, através das trocas gasosas com o ambiente externo. Uma forma de reduzir as conseqüências negativas da falta de aeração no ambiente de cultivo é a utilização de tampas providas de filtros impermeáveis a microorganismos e que assegurem um gradiente mínimo das pressões parciais dos gases entre a atmosfera interna e externa dos recipientes de cultivo (Gonçalves, 2004).

Vários meios básicos têm sido utilizados na multiplicação de plantas, sendo que a maioria se baseia no meio MS. Modificações e diluições deste meio têm apresentado bons resultados para diversas espécies. Diversos autores têm relatado a possibilidade de reduzir as concentrações de sais do meio MS visando o melhor desenvolvimento das plantas e redução dos custos (SILVEIRA et al., 2001).

Este trabalho teve como objetivo estabelecer a concentração salina do meio de cultura MS e o tipo de vedação dos frascos adequados ao estabelecimento *in vitro* desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas, Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas- RS.

Os tratamentos constituíram-se de dois tipos de vedação dos tubos (alumínio e algodão) e quatro concentrações dos sais do meio nutritivo MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), (25, 50, 75 e 100%) totalizando oito tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x4 com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de cinco tubos de ensaio com um explante cada.

Para o estabelecimento *in vitro* foram utilizados segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento, obtidos de plantas matrizes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I, mantidas em casa de vegetação, estas não receberam tratamento prévio ao estabelecimento. As plantas foram levadas ao laboratório onde sofreram uma toaleta eliminando as folhas na altura do pecíolo. Em câmara de fluxo laminar, os ramos foram imersos em álcool 70% por 10 segundos, seguidos pela imersão em hipoclorito de cálcio na concentração de 2,5%, adicionado de uma gota de Tween 20, durante 10 minutos. Após a desinfestação o material foi lavado em água estéril por três vezes para posterior retirada dos explantes (segmentos nodais) sendo colocados individualmente em tubos de ensaio com 5 ml de meio de cultura.

O meio de cultura utilizado foi composto pelos sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) adicionados de 5 μ M da citocinina BAP, 100 mg.L⁻¹ mio-inositol, 30 g.L⁻¹ sacarose, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 7,0 g.L⁻¹ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento na condição de escuro por sete dias (temperatura de 25 $\pm$ 2°C) sendo então transferidos para condições de intensidade de luminosa de 27 μ mol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 $\pm$ 2°C.

Foram realizadas avaliações aos sete, quatorze e vinte e um dias quanto à percentagem de contaminação bacteriana e percentagem de contaminação fúngica. Aos 45 dias de cultivo o material foi avaliado quanto à percentagem de estabelecimento, percentagem de sobrevivência, percentagem de oxidação, número de brotações, comprimento de brotações. A sobrevivência foi indicada pela coloração verde do explante, e o estabelecimento determinado pela emissão de folhas ou broto no explante.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan ($\alpha=0,05$), e regressão polinomial através do uso do programa estatístico WINSTAT (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002). Os dados de número de brotações foram transformados em $\sqrt{x} + 0,5$, onde x é o valor obtido. Os dados de percentagem foram transformados em arco seno de $x/100$, onde x é o percentual obtido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise de variância pode-se observar que houve diferença significativa para o fator concentração salina do meio de cultura para as variáveis percentagem de sobrevivência e percentagem de estabelecimento. Verificou-se interação entre os fatores concentração salina do meio de cultura e tipo de vedação para a variável percentagem de contaminação bacteriana. Já as variáveis percentagem de contaminação fúngica, percentagem de oxidação, número de brotações e comprimento das brotações não diferiram estatisticamente.

O único tratamento que apresentou contaminação bacteriana (Tabela 10A) foi quando os sais do meio de cultura MS foram reduzidos a 50% com a utilização da tampa de algodão (Tabela 1). Como este foi o único tratamento a apresentar contaminação bacteriana, ao que parece, esta pode ter sido causada durante a manipulação dos explantes. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) a utilização de tampas que vedam totalmente os frascos podem ser boas para a maior prevenção da contaminação.

A percentagem de contaminação fúngica (Tabela 11A) foi de 5% em todo o experimento. De modo geral, os valores de contaminação observados neste trabalho podem ser considerados baixos, indicando que a metodologia utilizada foi eficaz para o estabelecimento desta espécie. A boa condição fitossanitária das plantas-matrizes mantidas em casa de vegetação também é um fator determinante no sucesso da desinfestação da cultura.

Tabela 1- Percentagem de contaminação bacteriana no estabelecimento *in vitro* de marmeleiro japonês cv ANDRAMIG I, em função da forma de vedação dos frascos e do meio de cultura. Pelotas/RS, 2009.

	Contaminação Bacteriana	
	Algodão	Alumínio
25%	0a B	0a A
50%	65a A	0b A
75%	0a B	0a A
100%	0a B	0a A

Médias seguidas por letras distintas (minúsculas na linha e maiúsculas na coluna) diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

As variáveis percentagem de sobrevivência e percentagem de estabelecimento (Tabela 13A, 14A) apresentaram resultados superiores quando os explantes foram cultivados em meio MS completo, 100% dos sais (Figura1). Através da análise de regressão é possível verificar que a percentagem de sobrevivência e a percentagem de estabelecimento apresentam o mesmo comportamento, e que tendem a aumentar com o aumento da concentração salina do meio de cultura MS. Quando a concentração salina do meio de cultura foi reduzida a 50% pode-se observar uma baixa percentagem de explantes sobreviventes e estabelecidos e isto, pode ser explicado devido a alta percentagem de explantes contaminados que este tratamento apresentou.

Apesar da variável percentagem de oxidação (Tabela 12A) não diferir estatisticamente para os tratamentos, a utilização da vedação com algodão aparentemente reduziu o número de explantes oxidados. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) a vedação total dos frascos, além de causar o acúmulo de gases liberados pela cultura, leva a saturação de vapor de água que diminui o fluxo transpiratório nas culturas, podendo causar deficiências minerais, ocasionando a necrose de ápices.

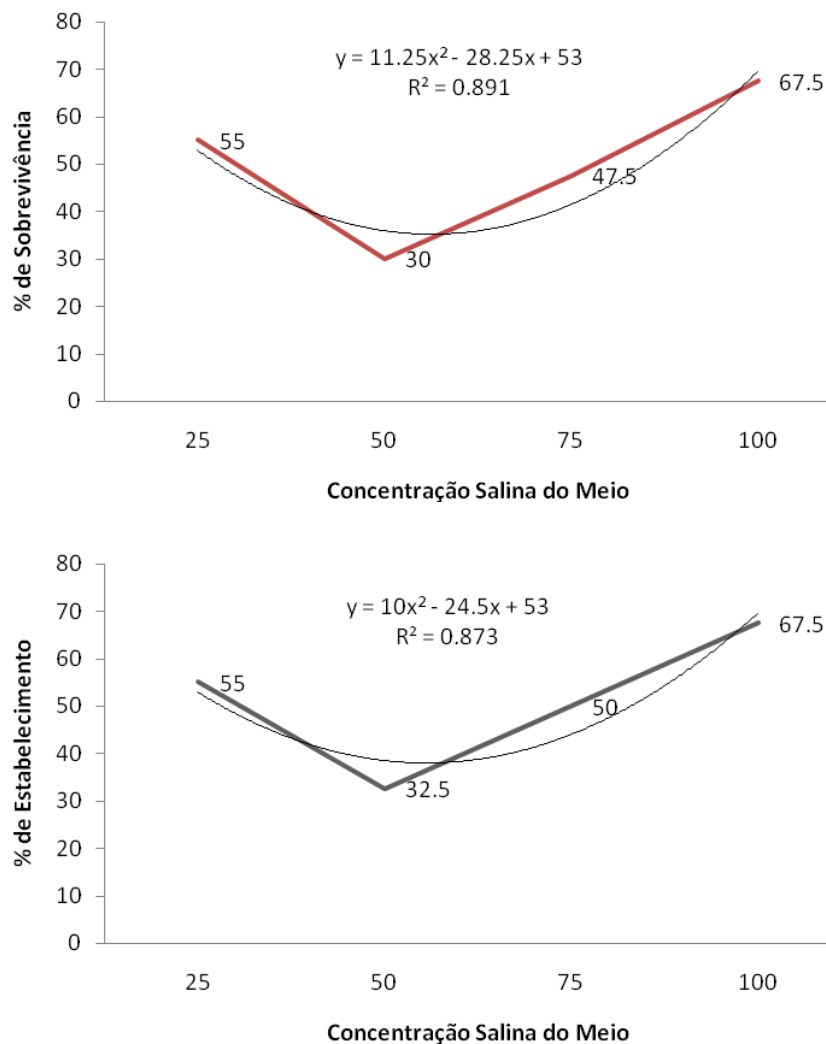


Figura 1- Percentagem de sobrevivência e percentagem de estabelecimento de marmeleiro japonês cv ANDRAMIG I, em função da concentração salina do meio de cultura. Pelotas/RS, 2009.

As variáveis número médio de brotações (Tabela 15A) e comprimento médio das brotações (Tabela 16A) não apresentaram diferença para os tratamentos testados.

Kauppinen (2001) testou modificações do meio MS em três genótipos de marmeleiro japonês, com o propósito de aperfeiçoar o protocolo de multiplicação *in vitro* para esta cultura. Os meios testados foram o meio MS

completo e o meio MS com 75% da concentração original de macro nutrientes, combinado com concentrações de BAP (0.5 , 1.0 e 2.0 mg.L^{-1}), de ácido indolbutírico (AIB) (0 e 0.1 mg.L^{-1}) e de ferro (NaFeEDTA 36.7 mg.L^{-1} e 73.8 mg.L^{-1} , ou FeEDDHA 41.62 mg.L^{-1}), e observou que o meio não teve efeito significativo na multiplicação desta espécie, e que algumas diferenças foram observadas somente em função do genótipo.

CONCLUSÕES

A utilização do meio MS com a concentração original dos sais aumenta a percentagem de sobrevivência e estabelecimento dos explantes.

CAPITULO III

Meio de cultura e concentração da citocinina BAP no estabelecimento in vitro de marmeleiro Japonês cultivar ANDRAMIG I

INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa de plantas frutíferas é a mais recomendada, pois possibilita a manutenção das boas características da planta. Trabalhos realizados no sentido de definir um protocolo de propagação para o marmeleiro 'Japonês', envolvendo a propagação vegetativa, não mostraram resultados satisfatórios, devido à baixa percentagem de enraizamento de suas estacas. Neste contexto a micropropagação surge com uma alternativa viável de propagação vegetativa.

Os meios de cultura constituem parte essencial da cultura de tecido, fornecendo as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em parte, o padrão do desenvolvimento (CALDAS *et al.*, 1998). Desta forma, os meios nutritivos baseiam-se nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações, para atender às necessidades de cada espécie no cultivo *in vitro*. Para cada situação (tipo de explante, espécie, cultivar e objetivo), o meio adequado e eficiente é variável (PASQUAL, 2001).

Os meios de cultivo possuem grande quantidade de macro e micronutrientes em diferentes proporções, responsáveis pelo crescimento da planta como um todo, carboidratos como fonte de carbono (sacarose, glucose, maltose), vitaminas (tiamina, piridoxina e ácido ascórbico), além de outros nutrientes como inositol e sorbitol (DAMIÃO FILHO, 1995; HU; FERREIRA, 1998). Não há uma formulação padrão para o meio de cultura, mas o meio MS, suas modificações e diluições têm apresentado bons resultados para diversas espécies, entretanto, com espécies lenhosas o meio MS não tem mostrado resultados satisfatórios. Formulações especialmente desenvolvidas para espécies lenhosas como, por exemplo, o meio WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980), com menores concentrações de sais (especialmente nitrogênio e potássio), tem sido descritas e utilizadas frequentemente como alternativa ao meio MS.

No estabelecimento *in vitro* a adição de fitorreguladores tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz. A adição de citocininas é favorável, as concentrações de citocininas podem variar bastante em função da espécie e do tipo de explante. Meios com concentrações de 0,05 a 1,0 mg.L⁻¹ de BAP têm sido usados com bons resultados para o cultivo de ápices caulinares de várias espécies herbáceas e lenhosas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Este trabalho teve como objetivo testar o meio de cultura e a concentração da citocinina BAP adequados ao estabelecimento *in vitro* de marmeleiro japonês.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas, Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas/RS.

Os tratamentos constituíram-se de dois meios de cultura (MS e WPM) e três concentrações da citocinina BAP (0, 1 e 2 mg.L⁻¹) totalizando seis tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3 com quatro repetições por tratamento. Cada repetição constitui-se de cinco tubos de ensaio com um explante cada.

Para o estabelecimento *in vitro* foram utilizados segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento, obtidos de plantas matrizes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I, mantidas em casa de vegetação, estas não receberam nenhum tratamento prévio ao estabelecimento. As plantas foram levadas para o laboratório onde sofreram uma toalete eliminando as folhas na altura do pecíolo. Em câmara de fluxo laminar, os ramos foram imersos em álcool 70% por 10 segundos, seguidos pela imersão em hipoclorito de cálcio na concentração de 2,5%, adicionado de uma gota de Tween 20, durante 10 minutos. Após a desinfestação o material foi lavado em água estéril por três vezes para posterior retirada dos explantes (segmentos nodais) sendo colocados individualmente em tubos de ensaio com 5 ml de meio de cultura.

O meio de cultura utilizado foi composto pelos sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e pelos sais e vitaminas do meio WPM - Wood Plant Medium (LLOYD; MCCOWN, 1980), conforme o tratamento, adicionados de diferentes concentrações da citocinina 6- benzilaminopurina (BAP), 100 mg.L⁻¹ mio-inositol, 30 g.L⁻¹ sacarose, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 7,0 g.L⁻¹ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento na condição de escuro por sete dias (temperatura de 25 ± 2°C) sendo então transferidos para condições de intensidade de luminosa de 27 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C.

Foram realizadas avaliações aos sete, quatorze e vinte e um dias quanto à percentagem de contaminação bacteriana, percentagem de contaminação fúngica. Aos 45 dias de cultivo o material foi avaliado quanto à percentagem de estabelecimento, percentagem de sobrevivência, percentagem de oxidação, número de brotações, comprimento de brotações. A sobrevivência foi indicada

pela coloração verde do explante, e o estabelecimento foi determinado pela emissão de folhas ou broto no explante.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan ($\alpha=0,05$) através do uso do programa estatístico WINSTAT (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002). Os dados de número de brotações foram transformados em $\sqrt{x} + 0,5$, onde x é o valor obtido. Os dados de percentagem foram transformados em arco seno de $x/100$, onde x é o percentual obtido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise de variância pode-se observar que houve interação significativa para os fatores meio de cultura (MS e WPM) e concentração de BAP (0, 1.0 e 2.0 mg.L⁻¹) para as variáveis contaminação bacteriana, contaminação fúngica, percentagem de sobrevivência dos explantes e número de brotações. Para a variável estabelecimento e comprimento das brotações houve efeito significativo somente do fator meio de cultura.

As percentagens de contaminação bacteriana e fúngica (Tabela 17A, 18A) foram elevadas neste experimento (Tabela 1). Para a variável contaminação bacteriana o tratamento WPM com 1mg.L⁻¹ de BAP diferiu de todos os outros, apresentando a maior taxa de contaminação. Já para a variável contaminação fúngica os tratamentos com meio MS e 1mg.L⁻¹ ou 2mg.L⁻¹ de BAP diferiram dos outros apresentando as menores taxas de contaminação. O que pode ter ocorrido é que alguns ramos da planta-matriz não estivessem em um bom estado fitossanitário na casa de vegetação, fator que contribui na desinfestação superficial dos explantes no momento do estabelecimento *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O que se pode observar é que apesar da alta percentagem de sobrevivência dos explantes, nem todos se desenvolveram e chegaram a se estabelecer *in vitro*. Segundo Erig e Schuch (2003) a alta percentagem de sobrevivência de

explantes nem sempre pode ser usado como um indicativo de que haverá o estabelecimento de plantas a partir destes explantes.

Tabela 1- Percentagem média de contaminação bacteriana e fúngica no estabelecimento in vitro de marmeleiro japonês cv. ANDRAMIG I, em função do meio de cultura e da concentração de BAP. Pelotas/RS, 2009.

Contaminação Bacteriana		
	MS	WPM
0	13 a A	0 a A
1	7 a A	27 b B
2	0 a A	7 a A
Contaminação Fúngica		
	MS	WPM
0	53 a A	27 a A
1	20 a B	40 a A
2	7 a B	33 a A

Médias seguidas por letras distintas (minúscula na linha e maiúscula na coluna) diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0.05$).

A variável percentagem de sobrevivência (Tabela 20A) apresentou interação entre os fatores, sendo o meio MS com adição de BAP nas concentrações de 1mg.L^{-1} e 2mg.L^{-1} e o meio WPM sem adição de BAP e com a adição de 1mg.L^{-1} onde houve maior percentual de sobrevivência dos explantes (Tabela 2).

A variável percentagem de estabelecimento (Tabela 21A) foi significativa para o fator meio de cultura, sendo que o meio WPM foi superior no estabelecimento de explantes comparado ao meio MS (Tabela 3). Silva (2006) obteve maior percentagem de estabelecimento de explantes de mirtilheiro cv. Delite utilizando o meio WPM ao invés do meio MS, resultados semelhantes foram obtidos por Melo (1999), testando diferentes meios (WPM, DKW e MS) no estabelecimento in vitro de aceroleira, observaram que o meio WPM apresentou os melhores resultados.

Tabela 2- Percentagem média de sobrevivência no estabelecimento *in vitro* de marmeleiro japonês cv. ANDRAMIG I, em função do meio de cultura e da concentração de BAP. Pelotas/RS, 2009.

Sobrevivência		
	MS	WPM
0	33.3 a B	53.3 a A
1	73.3 a A	33.3 b A
2	73.3 a A	60.0 a A

Médias seguidas por letras distintas (minúscula na linha e maiúscula na coluna) diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0.05$).

Para o número médio de brotações houve interação entre os fatores (Tabela 22A), a utilização do meio WPM na ausência de BAP ou com a adição nas concentrações de 1 mg.L^{-1} ou 2 mg.L^{-1} , assim como o meio MS com adição de 1 mg.L^{-1} apresentaram médias superiores (Tabela 4). Garcia et al. (2008) observaram que o meio WPM apresentou maior número de brotações comparado ao meio MS no estabelecimento *in vitro* de *Eugenia pyriformis* Cambess. Péres- Tornero e Burgos (2000) observaram que cultivares de damasqueiro (Búlida, Currot, Helena e Lorna) apresentaram maior percentual de brotos formados em meio WPM com adição de K_2SO_4 comparado ao meio MS. Melo et al. (1999) concluíram que os meios WPM e DKW favoreceram o maior número de brotações no estabelecimento *in vitro* de aceroleira.

Tabela 3. Percentagem de explantes estabelecidos *in vitro* de marmeleiro japonês cv. ANDRAMIG I. UFPel, Pelotas/RS, 2009.

Percentagem de estabelecimento	
MS	15 b
WPM	38 a

Médias seguidas de letra distinta diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0.05$).

Chaves (2003) obteve resultados semelhantes comparando dois tipos de meios (MS e WPM) sobre o número de gemas de *Prunus* cultivados *in vitro*, onde o meio WPM resultou em índices superiores ao MS. Já em trabalho realizado por Erig e Schuch (2004), foi observado na multiplicação de marmeleiro cv. MC, que o meio MS mostrou-se superior ao WPM em relação à indução de brotações. Estes resultados comprovam que os meios nutritivos se baseiam nas exigências de cada planta.

Tabela 4. Número médio de brotações no estabelecimento *in vitro* de marmeleiro japonês cv. ANDRAMIG I, em função do meio de cultura e da concentração de BAP. Pelotas/ RS, 2009.

Número de brotações		
	MS	WPM
0	0 b B	1 a A
1	1.16 a A	1.1 a A
2	0.33b B	1.25 a A

Médias seguidas da mesma letra (minúscula na linha e maiúscula na coluna) não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0.05$).

O comprimento das brotações apresentou diferença para o fator meio de cultura (Tabela 23A), sendo o meio WPM foi superior ao meio MS, com 0,58 cm e de 0,13 cm, respectivamente (Figura 1). Campos (2005) observou um leve incremento no comprimento das brotações de porta-enxerto de *Prunus* quando utilizou os meios WPM $\frac{1}{2}$ e WPM $\frac{3}{4}$, quando comparado com o meio MS e suas diluições.

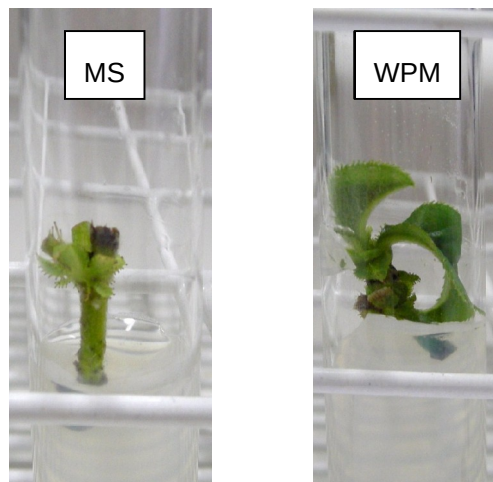


Figura 1- Explantes de marmeleiro japonês cv. ANDRAMIG I estabelecidos em diferentes meios de cultura. Pelotas/ RS, 2008.

CONCLUSÕES

O meio WPM foi mais eficiente no estabelecimento in vitro desta espécie quando comparado ao meio MS.

O meio WPM sem BAP ou com adição, em ambas concentrações testadas, assim como o meio MS com adição de 1 mg.L^{-1} são eficientes para aumentar o número de brotações. O meio WPM estimula o alongamento das brotações.

CAPITULO IV

Qualidade da luz no estabelecimento in vitro de marmeleiro Japonês cultivar ANDRAMIG I

INTRODUÇÃO

A luz é um fator fundamental para as plantas, seja pela ação direta ou indireta na regulação de seu crescimento e desenvolvimento (MORINI; MULEO, 2003). Alguns estudos têm demonstrado que a qualidade da luz influencia na eficiência biológica dos fitorreguladores adicionados ao meio de cultura, bem como no balanço hormonal dos tecidos. As respostas das plantas não dependem apenas da ausência ou presença de luz, mas também da variação em qualidade luminosa (FELIPPE, 1986). De acordo com Morini e Muleo (2003), para otimizar a captação da energia luminosa para a fotossíntese, as plantas desenvolveram uma série de fotorreceptores que regulam seu crescimento e desenvolvimento em relação a presença, quantidade, direção, duração e qualidade da radiação luminosa incidente.

Na cultura de tecidos a fonte de luz geralmente utilizada é a lâmpada fluorescente branca-fria, citada na maioria dos trabalhos (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999), mas esse tipo de luz não é considerado como ótimo, pois estas lâmpadas possuem diferentes comprimentos de ondas. A utilização de filtros de luz, os quais são colocados sobre os frascos, têm demonstrado bons resultados no alongamento de brotações, aumento do número de entrenós, e

aumento no teor de clorofila (PIAGNANI et al., 2002; MULEO et al., 2001). O filtro de luz tem função de selecionar a transmissão ou bloquear a absorção de elementos do espectro, emitido a partir de uma fonte de luz.

Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito da qualidade da luz no estabelecimento *in vitro* de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas, Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas-RS.

Para o estabelecimento *in vitro* foram utilizados segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento, obtidos de plantas matrizes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I, mantidas em casa de vegetação, estas não receberam nenhum tratamento prévio ao estabelecimento. As plantas foram levadas para o laboratório onde sofreram uma toalete eliminando as folhas na altura do pecíolo. Em câmara de fluxo laminar, os ramos foram imersos em álcool 70% por 10 segundos, seguidos pela imersão em hipoclorito de cálcio na concentração de 2,5%, adicionado de uma gota de Tween 20, durante 10 minutos. Após a desinfestação o material foi lavado em água estéril por três vezes para posterior retirada dos explantes (segmentos nodais) sendo colocados individualmente em tubos de ensaio com 5 ml de meio de cultura.

Os tratamentos constituíram de três diferentes tipos de luz sob os quais os explantes cresceram (branca- testemunha, verde e vermelha). Os diferentes tipos de luz foram fornecidos por meio da modificação do espectro luminoso das lâmpadas fluorescentes brancas-frias, utilizando filtros coloridos de acetato de celulose do tipo Lee Filters (Walworth Ind. Estate, Andover, England) com as seguintes especificações: verde (número 121 *Lee Green*) e vermelho (número 106 *Primary red*). Os filtros foram colocados sobre os frascos de cultivo, que foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e intensidade de luminosa de $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Para o tratamento luz branca (testemunha) os frascos não foram cobertos por filtro.

O meio de cultura utilizado foi composto pelos sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionados de 100 mg.L^{-1} mio-inositol, 30 g.L^{-1} sacarose e adicionado de 1 mg.L^{-1} de BAP. O pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento na condição de escuro por sete dias (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$).

Aos 45 dias de cultivo o material foi avaliado quanto à percentagem de estabelecimento, percentagem de sobrevivência, percentagem de oxidação, número de brotações, comprimento das brotações e número de folhas. A sobrevivência foi indicada pela coloração verde do explante, e o estabelecimento foi determinado pela emissão de folhas ou broto no explante.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan ($\alpha=0,05$), através do uso do programa estatístico WINSTAT (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002). Os dados de número de brotações foram transformados em $\sqrt{x} + 0,5$, onde x é o valor obtido. Os dados de percentagem foram transformados em arco seno de $x/100$, onde x é o percentual obtido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise de variância verificou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis percentagem de oxidação (Tabela 26A), percentagem de sobrevivência (Tabela 27A), percentagem de estabelecimento (Tabela 28A).

Donini et al. (2008) observaram no estabelecimento *in vitro* de três cultivares de oliveira (Koroneiki, Picual e Frantoio) que a luz branca promoveu maiores percentagens de sobrevivência e estabelecimento.

Para a variável número médio de brotações (Tabela 29A) observou-se que o filtro de luz na cor vermelha apresentou maior média (1.86), diferindo dos tratamentos que utilizaram luz branca e verde (Figura 1). Resultados semelhantes foram observados por Norton et al. (1998) e Betemps et al. (2008), o primeiro autor observou que a utilização de luz vermelha incrementou o número de brotações em culturas *in vitro* de *Rhododendron*, *Potentilla* e *Spiraea*. Os outros autores observaram no cultivo *in vitro* de mirtilheiro (*Vaccinium Ashei* Reade) cv Delite a utilização de luz verde e vermelha promoveu maior número de brotações.

Erig e Schuch (2005) obtiveram maior número de brotos na multiplicação *in vitro* de framboeseira 'Batum' utilizando luz verde e vermelha, 3,55 e 3,14 brotos respectivamente. Casano (1995) verificou que a luz verde promoveu maior no número de brotos no cultivo *in vitro* de porta-enxerto de macieira MM106. Baraldi et al. (1988) avaliando o efeito da qualidade de luz e da concentração de benziladenina (BA) no porta-enxerto de *Prunus* cv. GF 655-2 observaram maior número de brotações no tratamento testemunha, sem filtro.

Para a variável comprimento médio das brotações (cm) (Tabela 30A) foi observado que a luz vermelha promoveu as maiores médias (0,28 cm), seguidos da luz verde e branca respectivamente (Figura 2). Resultado semelhante foi obtido por Rossi et al. (2004) na micropropagação do clone I.S 5/23 porta-enxerto para *Prunus* spp onde as maiores médias foram obtidas nos tratamentos que utilizaram luz incandescente e luz vermelha. Marks e Simpson (1999) mencionam que a utilização de luz vermelha estimula o alongamento dos brotos em espécies lenhosas.

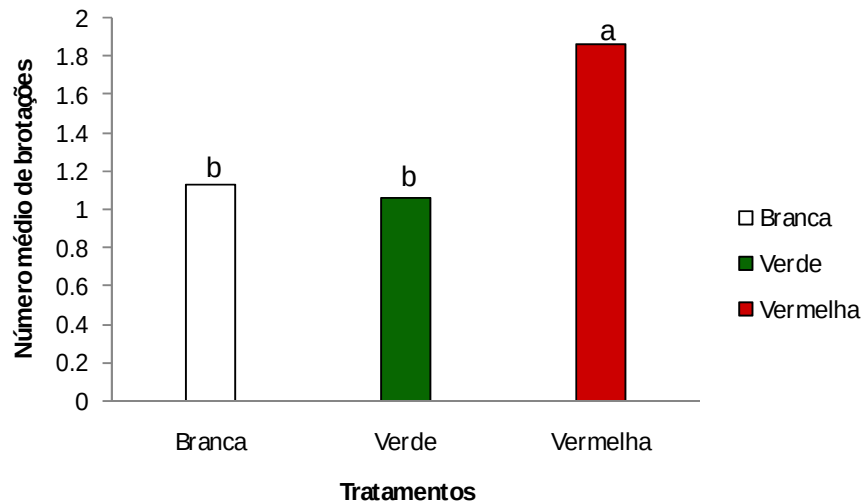


Figura 1. Efeito dos diferentes tratamentos no número médio de brotações dos explantes de marmeleiro japonês cv ANDRAMIG I. Pelotas/ RS, 2008. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

No cultivo in vitro de mirtilheiro cv. Delite, Betemps et al. (2008) observaram que a luz verde promoveu melhores resultados, Figueiredo et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes trabalhando com amoreira-preta cv. Xavante, onde a luz verde proporcionou maior comprimento das brotações. Turchetto et al. (2005) na micropropagação de *Tagetes* sp. observaram que a luz azul promoveu maior alongamento das brotações. Erig e Schuch (2006) observaram que a luz branca associada à citocinina Zea propicia melhores resultados na multiplicação in vitro de mirtilheiro cv Delite.

O aspecto geral dos brotos crescidos sob a luz vermelha não apresentou diferenças morfológicas daqueles crescidos sob a luz branca ou verde (Figura 3). Normalmente a exposição contínua ao escuro e a faixa de luz vermelho-escuro promove modificações morfológicas, entre elas menor expansão das folhas, entrenós alongados e síntese de clorofila, carotenóides e antocianinas muitas vezes reduzidas.

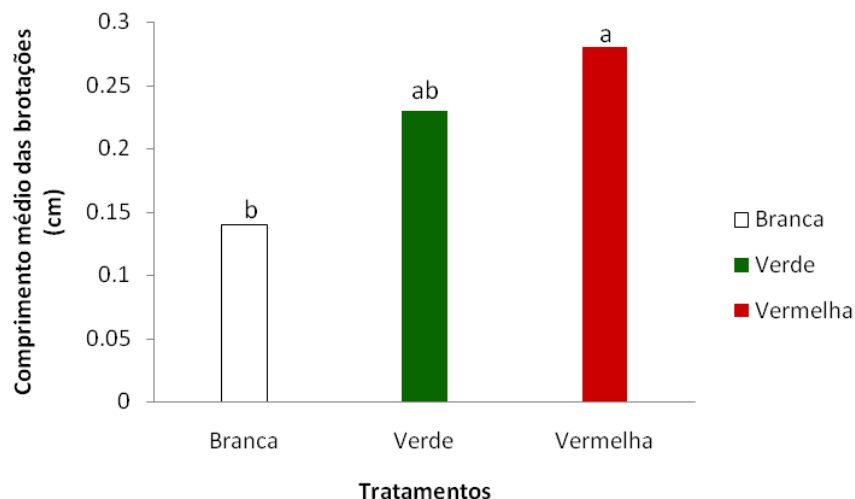


Figura 2. Efeito dos diferentes tratamentos no comprimento médio das brotações de marmeleiro japonês cv ANDRAMIG I. Pelotas/ RS, 2008. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

A variável número de folhas não apresentou diferença estatística para os tratamentos (Tabela 31A). Já Erig e Schuch (2005) observaram que a luz verde favoreceu o maior número médio de folhas no cultivo in vitro de framboeseira cv Batum. Não foram observadas diferenças no padrão de coloração das folhas dos explantes submetidos aos diferentes tratamentos.

De acordo com Hahn et al. (2000), a função do tipo de luz no crescimento e desenvolvimento das plantas ainda não está bem definida. Ela pode variar de acordo com a espécie, o estágio de crescimento, condições ambientais, composição do meio de cultura e a ventilação.

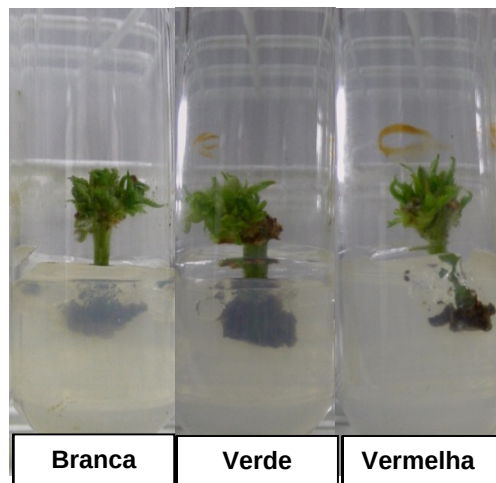


Figura 3. Aspecto geral das brotações de marmeleiro japonês cv ANDRAMIG I, cultivados sob diferentes filtros de luz. Pelotas/RS, 2008.

CONCLUSÕES

A utilização da luz vermelha promove aumento no número de brotos, assim como maior alongamento desses.

CONCLUSÕES GERAIS

O hipoclorito de cálcio proporciona baixas taxas de contaminação bacteriana e fúngica na desinfestação dos explantes.

A citocinina BAP promove aumento no número de folhas e de brotações e proporciona um maior alongamento destas.

O meio MS com a concentração original dos sais aumenta a percentagem de sobrevivência e estabelecimento dos explantes.

O meio WPM foi mais eficiente no estabelecimento in vitro desta espécie quando comparado ao meio MS.

O meio WPM sem BAP ou com adição, em ambas concentrações testadas, assim como o meio MS com adição de 1 mg.L^{-1} são eficientes para aumentar o número de brotações.

O meio WPM estimula o alongamento das brotações.

A utilização da luz vermelha promove aumento no número de brotos, assim como maior alongamento desses.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, E.; SOUZA, M. de; ALVARENGA, A. A. **A cultura do marmeleiro em Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1996. 23p. (EPAMIG - Boletim Técnico, 47).
- ABRAHÃO, E. ; ALVARENGA, A. A.; SOUZA, M.. Germinação das sementes de marmeleiro (*Chaenomeles sinensis* Koehene cv. Japonês). **Ciência e Prática**, v. 19, n., p. 342-343, 1995.
- ABRAHÃO, E.; ALVARENGA, A. A.; SOUZA, M. de. A produção extrativa de um novo marmeleiro no Sul do Estado de Minas Gerais. **Revista Ciência e Prática**, Lavras, v.16, n.1, p.78, 1992.
- ABRAHÃO, E.; ALVARENGA, A. A.; SOUZA, M. de. Caracterização de um pomar comercial de marmeleiros (*Chaenomeles sinensis* cv. Japonês) no Sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 13, n. 2, p. 183-184, 1991.
- ASSIS, T. F. de; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / Embrapa-CNPq, 1998, p.261-296.
- BANDEIRA, J.; LIMA, C. S. M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; FALQUETO, A.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. . Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L.. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, p. 474-476, 2007.
- BARALDI, R.; ROSSI, F.; LERCARI, B. *In vitro* shoot development of *Prunus* GF 655-2: interaction between light and benzyladenine. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.74, p.440-443, 1988.
- BETEMPS, D. L. ; FIGUEIREDO, G. S. ; LIMA, C. S. M. ; TOMAZ, Z. P. ; MOURA, G. ; PELIZZA, T. R. ; COSTA, V. B.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Multiplicação de mirtilo cv. Delite sob diferentes filtros de luz e concentrações de 6-benziladenina. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura e 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, 2008. Anais... **XX Congresso Brasileiro de Fruticultura**. Vitória : Tec Art Editora LTDA, 2008.
- BIANCHI, V. J.; CHAVES, A. da C.; SCHUCH, M. W.; FACHINELLO, J. C. Estabelecimento in vitro de marmeleiro: efeito do tipo de explante e tempo de imersão em hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, RS, v. 9, n. 2, p. 177-179, 2003.
- BONGA, J.M., VON ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Dordrecht : Kluwer, 1992. 498p.

CALDAS, L.S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. et al. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. V.2, p.87-132.

CAMPO-DALL'ORTO, F. A.; OJIMA, M.; RIGITANO, O. Pesquisas Em Maçã: Melhoramento Genético e Cultural. Série Documentos Técnicos / Bibl. IAC, 75020 - Mimeo., Campinas, SP., v. 1, p. 1-9, 1981.

CAMPO DALL'ORTO, F. A. **Marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.): propagação semínifera, citogenética e radiosensitividade: bases ao melhoramento genético e a obtenção de porta-enxertos**. 1982. 161 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

CAMPO DALL'ORTO, F. A.; OJIMA, M.; BARBOSA, W.; SANTOR, R. R.; MARTINS, F. P. ; SABINO, J. C.. Nespereiras Enxertadas Em Marmeleiro: Nova Opção de Produção Frutífera Sob Elevado Adensamento de Plantio. **O Agrônomo**, Campinas, SP., v. 42, n. 1, p. 17-27, 1990.

CAMPOS, R. V. **Estabelecimento, multiplicação e enraizamento in vitro de porta-enxertos de *Prunus* spp.**. 2005. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Fructicultura de Clima Temperado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CAMPOS, R. V. de ; ROCHA, P. S. G. da ; SCHUCH, M. W. ; FACHINELLO, J. C. ; BIANCHI, V. J. . Estabelecimento in vitro de porta-enxertos de *Prunus* spp. em dois meios de cultura com diferentes concentrações de sais. In: Encontro de Iniciação Científica, 9, Mostra de Pós-Graduação/UNITAU, 5, 2004, Taubaté. **Programa e Resumos**. Taubaté : Universidade de Taubaté, 2004. v. 1. p. 302-302.

CASANO, S. **Effetti della qualità della luce sulla morfogenesi di specie arboree da frutto coltivate in vitro**. Pisa, 1995. 97f. Dissertazione (Dottorato di Ricerca in Ortoflorofrutticoltura), Università Degli Studi di Pisa, Pisa, 1995.

CASTLE, W.S.; TUCKER, D.P.H.; KREZDORN, A.H.; YOUTSEY, C.O. **Rootstocks for Florida citrus**. Gainesville: Institute of Food and Agricultural Sciences – University of Florida, 1993. 92p.

CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. de L.; MÜLLER, N. T. G.; ZANOL, G. C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R. A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.2, p.181–186, 1999.

CHAVES, A. da C. **Micropropagação de porta-enxertos para fruteiras de caroço**. 2003. 59 f. Dissertação (Mestrado em Fructicultura de Clima temperado) Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.

CHAVES, A.C; SCHUCH, M. WALMOR, B. Desinfestação de explantes de *Prunus* CV MR.S. 2/5 com hipoclorito de sódio e cálcio. **Revista Brasileira Agrociência**, v.10. n. 2, p. 249- 250, 2004.

CHAVES, A. da C.; ROCHA, P.S.; BIANCHI, V.J.; et al. Desinfestação de explantes de *Prunus* cv. Mr.S. 2/5 no estabelecimento *in vitro*. **Simiente**, Santiago, v.72, n.3-4, p.111, 2002.

CHISTÉ, E.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W . Influência do tipo de vedação dos frascos, local de crescimento e sacarose na multiplicação *in vitro* de mirtilo, cultivar Delite. In: XV Congresso de Iniciação Científica e VIII Encontro de Pós-graduação, 2006, Pelotas. **Anais do XV Congresso de Iniciação Científica e VIII Encontro de Pós- Graduação**. Pelotas, 2006.

CUZZUOL, G.R.F.; GALLO, L. A.; ALMEIDA, M. de; CROCOMO, O. .J. 1995. Controle da vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. **Scientia Agricola**, 52 (3): 604- 615.

DAMIÃO FILHO, C. F. **Cultura de tecidos de plantas**: micropropagação. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 25 p.

DAMIANO, C.; PALOMBI, M.A. La micropropagazione 20 anni dopo: innovazioni tecniche e ottimizzazione dei protocolli delle colture *in vitro*. **Rivista di Frutticoltura**, Bologna, v. 62, n. 2, p. 48-55, 2000.

DEBERGH, P. C. Micropropagation of woody species state of the art on *in vitro* aspects. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 227, p. 287-295, 1988.

DEBNATH, S.C.; McRAE, K.B. An efficient *in vitro* shoot propagation of cranberry (*Vaccinium arcrocarpon* Ait.) by axillary bud proliferation. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, New York, v.37, n.2, p.243-249, 2001.

DONINI, L. P.; SCHUCH, M. W ; RIBEIRO, M. F.; SOUZA, J. A.; SOARES, G. C.. Avaliação da resposta de três cultivares de oliveira ao cultivo *in vitro* sob diferentes comprimentos de onda luminosa e efeitos da combinação de zeatina e ácido giberélico. **Scientia Agraria** (UFPR), v. 9, p. 229-233, 2008.

ENTELMANN, F. A.; PIO, R.; CHAGAS, E. A.; SIGNORINI, G.; CAMPO DALL'ORTO, F. A.; BARBOSA, W.; ALVARENGA, A. A.; ABRAHÃO, E. Emergência e desenvolvimento de seedlings de cultivares de marmeleiro para porta-enxertos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19., 2006, Cabo Frio. **Anais...** Cabo Frio: SBF, 2006. p. 161.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Fatores que afetam a multiplicação *in vitro* de Mirtilo. **Scientia Agraria**, v. 7, n. 1-2, p. 83-88, 2006.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 488-490, 2005.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Efeito da orientação do explante no meio de cultura, da concentração de sacarose e de ágar na multiplicação *in vitro* de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cv. MC. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.9, n.2, p.80-88, 2004.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* BORKH.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.3, p.221-227, 2003.

ERIG, A. C.; VICENZI, M.; CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; FACHINELLO, J. C. Desinfestação de explantes de Mirtilo (*Vaccinium Aschei* Reade) visando o estabelecimento de plantas *in vitro*. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 8, n. 1, p. 142-148, 2003.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: 2005. 221 p.

FELIPPE, G.M. Fotomorfogênese. In: FERRI, M.G. (coord.) **Fisiologia Vegetal 2**. São Paulo: EPU, 2.ed., 1986. p.231-280.

FILHO, W. B.; PEREIRA A. M. S.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Indução de Metabólitos Bioativos em Culturas de Células de *Maytenus Illicifolia*. **Eclética Química**. v.27 n. especial, São Paulo, 2002.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E.T.H. *et al.* Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus illicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 4, n.3, p.2001-2005, 1998.

GARCIA, M.M. ; FIGUEIREDO, G.S. ; DAMIANI, C. R. ; SCHUCH, M.W. . Estabelecimento *in vitro* de uvaia: tempo de desinfestação, desinfestante e meio de cultura. In: XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós-Graduação, 2008, Pelotas. **Anais XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós-Graduação**. Pelotas : UFPEL, 2008.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture techniques. In: GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics Limited, 1993, 574 p.

GEORGE, E. F., SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Aversely: Exegetic, 1984. 709 p.

GONÇALVES, L. A. ***Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae): anatomia, citogenética, citometria de fluxo e propagação *in vitro***. Viçosa: UFV, 2004. 88p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1998. p.99-170.

GUERRA, M.P. **Embriogênese somática em Euterpe edulis Mart. (Palmae)**. 1989. 202p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

HAHN, E. J. et al. Blue and red light emitting diodes with or without sucrose and ventilation affect in vitro growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets. **Journal of Plant Biology**, New York, v. 43, p. 247-250, 2000.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation; principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 770p.

HENSHAW, G.G.; O HARA, J.F., WEBB, K.J. Morphogenetic studies in plant tissue cultures. **Symposi Britanic Society Biological**, v.4, p.231-51, 1982.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, 1998. v.1. p. 371-393. 1998.

KAUPPINEN, S. Optimizing shoot proliferation and rooting of micropropagated Japanese quince (*Chaenomeles japonica* (Thumb.) Lindl. ex. Spach). **ISHS Acta Horticulturae 560: IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding**, 2001.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.55, p.141-145, 1999.

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

KURATA, K.; KOZAI, T. (eds). **Transplant production systems**. Dordrecht : Kluwer Academic, 1992. 299p.

LEITZKE, L. N. **Micropropagação fotoautotrófica de amoreira-preta (*rubus* spp.) e framboeseira (*rubus idaeus* L.) com a utilização de luz natural**. 2007, 88p. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Fruticultura de Clima Temperado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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

LEONTIEV-ORLOV, O.; ROGALSKI, M.; MOSSI, A.J.; CANSIAN, R.L. 6-Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*Prunus* sp.), **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.6, p.63-67, 2000b.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of *Mountain laurel*, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v.30, p.421-427, 1980.

MACHADO, A., CONCEIÇÃO, A. R. Programa estatístico WinStat - Sistema de Análise Estatístico para Windows, versão 2.0. Pelotas, RS, 2002.

MARKS, T.R.; SIMPSON, S.E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **Journal of Horticultural Science**, Ashford Kent, v.65, n.2, p.103-111, 1990.

MARTINELLI, A. Factors affecting *in vitro* propagation of the peachalmond hybrids "Hansen 21688" and "Hansen 536". **Acta Horticulturae**, Leuven, v.173, p.237-244, 1985.

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

MELO, N.F. et al. Estabelecimento do cultivo *in vitro* de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, n.1, p.102-107, 1999.

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n.36 e 37, p.5-10, 2000.

MONTEIRO, A.C.B. de A.; HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). **In Vitro Cellular and Development Biology**, v.36, p.527-531, 2000.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2003. p.3-35.

MULEO, R.; MORINI, S.; CASANO, S. Photoregulation of growth and branching of plum shoots: physiological action of two photosystems, **In vitro Cell Development Biologic**, Pisa, n. 37, p.609-617, 2001.

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

NORTON, C.R.; NORTON, M.E.; HERRINGTON, T.; PHILLIPS, D. Light quality and light pipe in the micropropagation of woody ornamental plants. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.226, p.413-416, 1988.

OJIMA, M.; RIGITANO, C.; SCARANARI, H. J.; MARTINS, F. P.; DALL'ORTO, F. C.; NAGAI, V. Estudo de porta-enxertos para o pessegueiro. **Bragantia**, Campinas, v. 37, n. 6, p. 45-52, 1978.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**: tecnologia e aplicações: meios de cultura. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

PÉREZ-TORNERO, O.; LOPEZ, J.M.; EGEA, J.; BURGOS, L. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v.75, p.283-286, 2000.

PIAGNANI, C.; IACONA, C.; INTRIERI, M.C.; MULEO, R. A new somaclone of *Prunus avium* shows diverse growth pattern under different spectral quality of radiation. **Biologia Plantarum**, Pisa, v.45, n.1, p.11-17, 2002.

PIERIK, R.L.M. Produccion de plantas libres de enfermedades In: PIERIK, R.L.M. (Ed.) **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Pronsa, 1990. p.169-180.

PIO, R.; CAMPO DALL'ORTO, F. A. ; ALVARENGA, A.A. ; ABRAHÃO, E. ; SIGNORINI, G.; CHAGAS, E. A. Enraizamento de estacas juvenis do marmeleiro Japonês estratificadas a frio e tratadas com AIB. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 71-74, 2007a.

PIO, R.; CAMPO DALL'ORTO, F. A. ; ALVARENGA, A.A. ; ABRAHÃO, E. ; CHAGAS, E. A.; SIGNORINI, G. Propagação do marmeleiro 'Japonês' por estaquia e alporquia realizadas em diferentes épocas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 570-574, 2007b.

PIO, R.; CHAGAS, E. A.; BARBOSA, W. ; SIGNORINI, G.; ALVARENGA, A.A. ; ABRAHÃO, E. ; CAZETTA, J. O. ; ENTELMANN, F.A. Emergência e desenvolvimento de plântulas de cultivares de marmeleiro para uso como porta-enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 133-136, 2007.

PIO, R.; RAMOS, J. D.; CHALFUN, N. N. J.; GONTIJO, T. C. A.; CARRIJO, E. P.; MENDONÇA, V.; ALVARENGA, A. A.; ABRAHÃO, E. Enraizamento de estacas dos marmeleiros 'Portugal' e 'Japonês' em diferentes ambientes e posições no recipiente. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 5, p. 968- 973, 2005.

PIO, R.; CHAGAS, E. A.; CAMPO DALL'ORTO, F. A.; BARBOSA, W. ; ALVARENGA, A. A.; ABRAHÃO, E. . Marmeleiro 'Japonês': nova opção de porta-enxerto para marmelos. **O Agrônomo**, v. 57, p. 15-16, 2005.

PIO, R.; ARAÚJO, J.P.C; SCARPARE FILHO, J.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; ALVARENGA, A.A.; ABRAHÃO, E. Potencial de propagação de cultivares de marmeleiro por estaquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.2, p.287-289, 2004.

RIBAS, L.L.F., ZANETTE, F. Propagação da macieira c.v. 'Gala' através da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v.1, n.4, p.39-43, 1992.

RIBEIRO, M. V.; LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J.; RUBIN, S.; BENITEZ, L. C.; PETERS, J. A; BRAGA, E. J. B. . Concentrações de sacarose e tipos de vedação no cultivo in vitro de *Melissa officinalis* L.. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 843-845, 2007.

RIGITANO, O. O marmelo e a sua cultura. São Paulo: **Melhoramentos**, 1957. 31p.

ROCHA, P. S. G.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; MISTURA, C. C. Estabelecimento in vitro de porta-enxerto de pessegueiro em diluições do meio MS acrescido de concentrações de BAP. **Bioscience Journal**, Uberlândia - MG, v. 23, n. 2, p. 83-87, 2007.

RODRIGUES, A.C.; SILVEIRA, C.A.P.; FORTES, G.R.L.; FACHINELLO, J.C.; SILVA, J.B. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Prunus* sp. Em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 25, n. 1, p. 131-133, 2003.

RODRIGUES, A. C.; FACHINELLO, J. C.; STRELOW, E.; FORTES, G. R. L. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 229-231, ago., 1999.

ROSSI, A.; RUFATO, L. ; FIASCHI, G. ; MORINI, S. ; LORETI, F. . Efeito da luz na micropropagação de clones da série I.S. - Porta-enxertos para *Prunus* spp. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 1, p. 55-59, 2004.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A.C. Micropropagação de plantas frutíferas. In. FACHINELO, J.C. et al. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005. p.155-173.

SILVA, L. C. da. **Estabelecimento *in vitro* de cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) para início da micropropagação**. 2006. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Fruticultura de Clima Temperado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SILVA, A. L.; RAGALSK, M.; MORAES, L. K. A.; FESBILINO, C; CRESTANI, L.; GUERRA, M. P. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 297-300, ago., 2003.

SILVA, P. C.; DIAS, J. M. M.; NEVES, J. C. L.; SALOMÃO, L. C. S.; COUCEIRO, M. A.; ROCHA, M. A. **Protocolo para desinfestação de sementes de tangerineira Cleópatra (*Citrus resnyi* Hort. ex Tan.)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. Anais...Belém: SBF, 2002. ICD-ROM.

SILVA, A. T. da; PASQUAL, M.; ISHIDA, J. S.; ANTUNES, L. E. C. Aclimação de plantas provenientes da cultura *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.49-53, 1995.

SILVEIRA, A.C.P.; FACHINELO, J.C.; FORTES, G.R. de L.; CITADIN, I.; RODRIGUES, A C.; QUEZADA, A C.; SILVA, J.B. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n. 3, p.488-492, 2001.

SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; DONINI, L. P.; RIBEIRO, M. F. Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.2046-2048, out, 2008.

STANDAERT DE METSENAERE, R.E.A. Economic considerations. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (eds). **Micropropagation**. Dordrecht : Kluwer Academic, 1991. p.131-140.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TEIXEIRA, P. T; SILVA, A. L.; DUCROQUET, J. H. J.; GUERRA, M. P. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* spp. 'Carelli'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.26, n.2, p. 377-379. Agosto, 2004.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 433p., 1990.

TURCHETTO A.C; NASSI F.L; ZANANDREA I; FIGUEIREDO P.M; PETERS J. A; BRAGA E.J. 2005. Multiplicação *in vitro* de *Tagetes* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 45. **Resumos...** Fortaleza: CBO (CD-ROM)

VESCO, L. D.; GUERRA, M. P. Organogênese e micropropagação da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 21, n. 1, p. 60-64, 1999.

VILLALOBOS A., V.M., THORPE, T.A. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: ROCA, W.M., MROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones**. Cali, Colombia : CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1991, p.127–141.

ZANETTI, L. J. R. **Produção integrada de maçãs: Pragas e manejo de *Neoseiulus californicus* (Mcgregor) (Phytoseiidae: Acari)**. Trabalho de conclusão de curso em engenharia agrônoma – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

APÊNDICE

Tabela 1A- Análise da variação e testes de significância para contaminação bacteriana aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes agentes desinfestantes a base de cloro.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Desinfestante	1	21.841403	21.8414	449.89	0
Repetição	4	0.50913323	0.1272833	.	.
Resíduo	116	5.6315487	0.04854783	.	.
Total	149	29.923269	.	.	.
Média Geral				0.428	
Coeficiente de Variação (%)				51.41	
Desvio Padrão				0.220	

Tabela 2A- Análise da variação e testes de significância para contaminação fúngica aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes agentes desinfestantes a base de cloro.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Desinfestante	1	0.052594971	0.05259497	24.955	2.093
Repetição	4	0.013039697	0.003259924	.	.
Resíduo	116	0.2444766	0.002107557	.	.
Total	149	0.40166257	.	.	.
Média Geral				0.030	
Coeficiente de Variação (%)				149.3	
Desvio Padrão				0.045	

Tabela 3A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de oxidação aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes agentes desinfestantes a base de cloro.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Desinfestante	1	0.82672707	0.8267271	72.927	0
Repetição	4	0.10198518	0.0254963	.	.
Resíduo	116	1.3150181	0.01133636	.	.
Total	149	6.9810591	.	.	.
Média Geral				0.103	
Coeficiente de Variação (%)				102.6	
Desvio Padrão				0.106	

Tabela 4A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de sobrevivência aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes agentes desinfestantes a base de cloro.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Desinfestante	1	0.67076318	0.6707632	27.831	3.66
Repetição	4	0.14136811	0.03534203	-	-
Resíduo	20	0.48202041	0.02410102	-	-
Total	29	1.5456218	-	-	-
Média Geral				0.243	
Coeficiente de Variação				63.65	
Desvio Padrão				0.155	

Tabela 5A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de explantes estabelecidos aos 45 dias de cultivo *in vitro* de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes agentes desinfestantes a base de cloro e diferentes reguladores de crescimento.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Desinfestante	1	0.7010534	0.7010534	29.782	2.425
Repetição	4	0.16106623	0.04026656	.	.
Resíduo	20	0.47078372	0.02353919	.	.
Total	29	1.584111	.	.	.
Média Geral				0.240	
Coeficiente de Variação (%)				63.78	
Desvio Padrão				0.153	

Tabela 6A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de explantes estabelecidos aos 45 dias de cultivo *in vitro* de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes reguladores de crescimento.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Regulador	2	0.18986015	0.09493007	4.0329	0.03377
Repetição	4	0.16106623	0.04026656	.	.
Resíduo	20	0.47078372	0.02353919	.	.
Total	29	1.584111	.	.	.
Média Geral				0.240	
Coeficiente de Variação (%)				63.78	
Desvio Padrão				0.153	

Tabela 7A- Análise da variação e testes de significância para número médio de brotações aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes reguladores de crescimento.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Regulador	2	1.4680837	0.7340418	15.629	8.178
Repetição	4	0.58886949	0.1472174	.	.
Resíduo	20	0.93931259	0.04696563	.	.
Total	29	4.6950625	.	.	.
Média Geral				1.346	
Coeficiente de Variação (%)				16.09	
Desvio Padrão				0.216	

Tabela 8A- Análise da variação e testes de significância para comprimento médio das brotações aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes reguladores de crescimento.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Regulador	2	0.71304667	0.3565233	5.925	0.0095
Repetição	4	0.16183333	0.04045833	.	.
Resíduo	20	1.2034467	0.06017233	.	.
Total	29	3.0198667	.	.	.
Média Geral				0.476	
Coeficiente de Variação (%)				51.46	
Desvio Padrão				0.245	

Tabela 9A- Análise da variação e testes de significância para número médio de folhas aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes agentes reguladores de crescimento.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Regulador	2	40.074416	20.03721	10.881	0.0006346
Repetição	4	6.9204801	1.73012	-	-
Resíduo	20	36.830227	1.841511	-	-
Total	29	129.75636	-	-	-
Média Geral				3.557	
Coeficiente de Variação (%)				38.14	
Desvio Padrão				1.357	

TABELA 10A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de contaminação bacteriana aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes tipos de vedação e concentrações de sais do meio de cultura.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Tampa	1	0.44771671	0.4477167	6.0805	0.02236
Concentração	3	1.3431501	0.4477167	6.0805	0.003811
Repetição	3	0.22089527	0.07363176	-	-
Tampa. Concent.	3	1.3431501	0.4477167	6.0805	0.003811
Resíduo	21	1.5462669	0.07363176	-	-
Total	31	4.9011792	-	-	-
Média Geral				0.118	
Coeficiente de Variação %				229.4	
Desvio Padrão				0.271	

TABELA 11A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de contaminação fúngica aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes tipos de vedação e concentrações de sais do meio de cultura.

Fontes	GL	SQ	QM	F	p
Tampa	1	0.0050681265	0.005068127	0.72414	0.4044
Concentração	3	0.025340633	0.008446878	1.2069	0.3316
Repetição	3	0.01520438	0.005068127	-	-
Tampa.Concent.	3	0.0050681265	0.001689376	0.24138	0.8665
Resíduo	21	0.14697567	0.006998841	-	-
Total	31	0.19765693	-	-	-
Média Geral			0.037		
Coeficiente de Variação			221		
Desvio Padrão			0.083		

Tabela 12A – Análise da variação e testes de significância para percentagem de explantes oxidados aos 45 dias de cultivo *in vitro* de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes tipos de vedação e concentrações de sais do meio de cultura.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Tampa	1	0.065224545	0.06522454	1.1455	0.2966
Concentração	3	0.094964674	0.03165489	0.55595	0.6499
Repetição	3	0.044669265	0.01488976	-	-
Tampa.Concent.	3	0.34449803	0.1148327	2.0168	0.1424
Resíduo	21	1.1957148	0.0569388	-	-
Total	31	1.7450713	-	-	-
Média Geral			0.389		
Coeficiente de Variação			61.25		
Desvio Padrão			0.238		

TABELA 13A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de sobrevivência aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes tipos de vedação e concentrações de sais do meio de cultura.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Tampa	1	0.014825889	0.01482589	0.26007	0.6154
Concentração	3	0.68379022	0.2279301	3.9982	0.02128
Repetição	3	0.050422145	0.01680738	-	-
Tampa.Concent.	3	0.22150003	0.07383334	1.2952	0.3022
Resíduo	21	1.1971579	0.05700752	-	-
Total	31	2.1676961	-	-	-
Média Geral				0.557	
Coeficiente de Variação				42.84	
Desvio Padrão				0.238	

TABELA 14A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de explantes estabelecidos aos 45 dias de cultivo *in vitro* de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes tipos de vedação e concentrações de sais do meio de cultura.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Tampa	1	0.043714861	0.04371486	0.87854	0.3593
Concentração	3	0.78879338	0.2629311	5.2842	0.007137
Repetição	3	0.037850853	0.01261695	-	-
Tampa.Concent.	3	0.22078543	0.07359514	1.4791	0.249
Resíduo	21	1.0449246	0.04975831	-	-
Total	31	2.1360691	-	-	-
Média Geral				0.541	
Coeficiente de Variação				41.16	
Desvio Padrão				0.223	

Tabela 15A- Análise da variação e testes de significância para número médio de brotações aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes tipos de vedação e concentrações de sais do meio cultura.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Tampa	1	0.052131465	0.05213147	0.66507	0.4239
Concentração	3	0.029247384	0.009749128	0.12437	0.9447
Repetição	3	0.34723241	0.1157441	-	-
Tampa.Concent.	3	0.11036205	0.03678735	0.46932	0.7068
Resíduo	21	1.6460882	0.07838515	-	-
Total	31	2.1850615	-	-	-
Média Geral				1.352	
Coeficiente de Variação				20.69	
Desvio Padrão				0.279	

TABELA 16A- Análise da variação e testes de significância para comprimento médio das brotações aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes tipos de vedação e concentrações de sais do meio de cultura.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Tampa	1	0.033153125	0.03315313	1.3536	0.2577
Concentração	3	0.030209375	0.01006979	0.41114	0.7467
Repetição	3	0.010434375	0.003478125	-	-
Tampa.Concent.	3	0.078784375	0.02626146	1.0722	0.3822
Resíduo	21	0.51434062	0.02449241	-	-
Total	31	0.66692188	-	-	-
Média Geral				0.363	
Coeficiente de Variação				43.06	
Desvio Padrão				0.165	

TABELA 17A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de contaminação bacteriana aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes meios de cultura e concentrações de BAP.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Meio	1	0.0094081175	0.009408117	0.88903	0.368
[]BAP	2	0.059951965	0.02997598	2.8326	0.106
Repetição	2	0.0047105135	0.002355257	-	-
Meio.[]	2	0.086981973	0.04349099	4.1097	0.04981
BAP					
Resíduo	10	0.10582403	0.0105824	-	-
Total	17	0.2668766	-	-	-
	Média Geral			0.089	
	Coeficiente de Variação			114.3	
	Desvio Padrão			0.102	

TABELA 18A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de contaminação fúngica aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes meios de cultura e concentrações de BAP.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Meio	1	0.020272506	0.02027251	0.76463	0.4024
[] BAP	2	0.13340261	0.0667013	2.5158	0.1303
Repetição	2	0.14006182	0.07003091	-	-
Meio.[]	2	0.29803464	0.1490173	5.6206	0.02313
BAP					
Resíduo	10	0.26512823	0.02651282	-	-
Total	17	0.8568998	-	-	-
	Média Geral			0.312	
	Coeficiente de Variação			52.06	
	Desvio Padrão			0.162	

TABELA 19A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de oxidação aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes meios de cultura e concentrações de BAP.

Fontes	GL	SQ	QM	F	p
Meio	1	0.0024537097	0.00245371	0.22931	0.6423
[] BAP	2	0.032331239	0.01616562	1.5107	0.2671
Repetição	2	0.0047105135	0.002355257	-	-
Meio.[] BAP	2	0.087178878	0.04358944	4.0736	0.05081
Resíduo	10	0.10700546	0.01070055	-	-
Total	17	0.2336798	-	-	-
Média Geral				0.056	
Coeficiente de Variação				183.3	
Desvio Padrão				0.103	

TABELA 20A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de sobrevivência aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes meios de cultura e concentrações de BAP.

Fontes	GL	SQ	QM	F	p
Meio	1	0.082674023	0.08267402	2.6955	0.1317
[] BAP	2	0.23726699	0.1186335	3.8679	0.05698
Repetição	2	0.36157368	0.1807868	-	-
Meio.[] BAP	2	0.40617866	0.2030893	6.6214	0.01474
Resíduo	10	0.30671595	0.0306716	-	-
Total	17	1.3944093	-	-	-
Média Geral				0.601	
Coeficiente de Variação				29.13	
Desvio Padrão				0.175	

TABELA 21A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de explantes estabelecidos aos 45 dias de cultivo *in vitro* de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes meios de cultura e concentrações de BAP.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Meio	1	0.26278111	0.2627811	7.8378	0.01881
[] BAP	2	0.13241912	0.06620956	1.9748	0.1893
Repetição	2	0.13058929	0.06529464	-	-
Meio.[] BAP	2	0.21676314	0.1083816	3.2326	0.08263
Resíduo	10	0.33527199	0.0335272	-	-
Total	17	1.0778246	-	-	-
Média Geral				0.280	
Coeficiente de Variação				65.30	
Desvio Padrão				0.183	

TABELA 22A- Análise da variação e testes de significância para número médio de brotações aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes meios de cultura e concentrações de BAP.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Meio	1	0.43272061	0.4327206	18.956	0.001435
[] BAP	2	0.29015422	0.1450771	6.3553	0.01655
Repetição	2	0.033906909	0.01695345	-	-
Meio.[] BAP	2	0.2563297	0.1281648	5.6144	0.02319
Resíduo	10	0.22827817	0.02282782	-	-
Total	17	1.2413896	-	-	-
Média Geral				1.113	
Coeficiente de Variação				13.57	
Desvio Padrão				0.151	

TABELA 23A- Análise da variação e testes de significância para comprimento médio das brotações aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes meios de cultura e concentrações de BAP.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Meio	1	0.90227222	0.9022722	27.065	0.0003999
[] BAP	2	0.13023333	0.06511667	1.9533	0.1923
Repetição	2	0.024233333	0.01211667	-	-
Meio.[] BAP	2	0.031344444	0.01567222	0.47012	0.6381
Resíduo	10	0.33336667	0.03333667	-	-
Total	17	1.42145	-	-	-
Média Geral				0.355	
Coeficiente de Variação				51.43	
Desvio Padrão				0.182	

TABELA 24A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de contaminação bacteriana aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes filtros de luz.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Luz	2	0.036040011	0.01802001	4	0.1111
Repetição	2	0.0090100027	0.004505001	-	-
Resíduo	4	0.018020005	0.004505001	-	-
Total	8	0.063070019	-	-	-
Média Geral				0.044	
Coeficiente de Variação				150	
Desvio Padrão				0.067	

TABELA 25A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de contaminação fúngica aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes filtros de luz.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Luz	2	0.0090100027	0.004505001	1	0.4444
Repetição	2	0.036040011	0.01802001	-	-
Resíduo	4	0.018020005	0.004505001	-	-
Total	8	0.063070019	-	-	-
Média Geral				0.044	
Coeficiente de Variação				150	
Desvio Padrão				0.067	

TABELA 26A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de oxidação aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes filtros de luz.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Luz	2	0.076639829	0.03831991	0.5412	0.6194
Repetição	2	0.21687613	0.1084381	-	-
Resíduo	4	0.28322238	0.0708056	-	-
Total	8	0.57673834	-	-	-
Média Geral				0.402	
Coeficiente de Variação				66.16	
Desvio Padrão				0.266	

TABELA 27A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de sobrevivência aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes filtros de luz.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Luz	2	0.16049026	0.08024513	1.5715	0.3136
Repetição	2	0.11710777	0.05855388	-	-
Resíduo	4	0.20425651	0.05106413	-	-
Total	8	0.48185454	-	-	-
Média Geral				0.580	
Coeficiente de Variação				38.95	
Desvio Padrão				0.225	

TABELA 28A- Análise da variação e testes de significância para percentagem de explantes estabelecidos aos 45 dias de cultivo *in vitro* de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes filtros de luz.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Luz	2	0.13771399	0.06885699	1.7007	0.2921
Repetição	2	0.14655228	0.07327614	-	-
Resíduo	4	0.16195192	0.04048798	-	-
Total	8	0.44621819	-	-	-
Média Geral				0.499	
Coeficiente de Variação				40.28	
Desvio Padrão				0.201	

TABELA 29A- Análise da variação e testes de significância para número médio de brotações aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes filtros de luz.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Luz	2	1.1822222	0.5911111	7	0.04938
Repetição	2	0.86222222	0.4311111	-	-
Resíduo	4	0.33777778	0.08444444	-	-
Total	8	2.3822222	-	-	-
Média Geral				1.355	
Coeficiente de Variação				21.43	
Desvio Padrão				0.290	

TABELA 30A- Análise da variação e testes de significância para comprimento médio das brotações aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes filtros de luz.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Luz	2	0.030488889	0.01524444	7.84	0.04131
Repetição	2	0.020422222	0.01021111	-	-
Resíduo	4	0.007777778	0.001944444	-	-
Total	8	0.058688889	-	-	-
Média Geral				0.211	
Coeficiente de Variação				19.94	
Desvio Padrão				0.044	

TABELA 31A- Análise da variação e testes de significância para número médio de folhas aos 45 dias de cultivo *in vitro* em explantes de marmeleiro japonês cultivar ANDRAMIG I com utilização de diferentes filtros de luz.

Fontes	GL	SQ	QM	F	P
Luz	2	0.55167679	0.2758384	2.4312	0.2037
Repetição	2	0.87160612	0.4358031	-	-
Resíduo	4	0.45383725	0.1134593	-	-
Total	8	1.8771202	-	-	-
Média Geral				3.330	
Coeficiente de Variação				10.11	
Desvio Padrão				0.336	

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.