

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Agronomia

**CULTIVO *IN VITRO* DE BEIJO-DE-FRADE: CRESCIMENTO
INICIAL E MULTIPLICAÇÃO**

Parthenis dos Santos Batista



Parthenis dos Santos Batista

CULTIVO *IN VITRO* DE BEIJO-DE-FRADE: CRESCIMENTO INICIAL E
MULTIPLICAÇÃO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial, para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Profa. Dra. Claudineia Ferreira Nunes

Montes Claros
Instituto de Ciências Agrárias – UFMG
2018

Parthenis dos Santos Batista. **CULTIVO *IN VITRO* DE BEIJO-DE-FRADE:
CRESCIMENTO INICIAL E MULTIPLICAÇÃO**

Aprovado pela banca examinadora constituída por:

Prof. Demerson Arruda Sanglard – ICA/UFMG

Laura Souza Santos – Mestranda ICA/UFMG

Profa. Claudineia Ferreira Nunes – Orientadora ICA/UFMG

Montes Claros, 21 de Junho de 2018.

Dedico aos meus pais, à minha família, aos meus avós por todo amor e apoio. Aos meus amigos, e colegas que me incentivaram e me deram força a conclusão de diversas atividades durante o curso de Agronomia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Maria do Carmo, por sempre me apoiar e acreditar em mim. Ao meu pai Robson, pelo incentivo constante. Agradeço à minha família, em especial aos meus avós pelo amor e apoio.

À professora Claudineia, pela orientação, paciência e por ter me auxiliado tanto no decorrer do Trabalho de Conclusão de curso.

Ao laboratório de Biotecnologia, do Instituto de Ciências Agrárias

Aos professores, coordenação e secretaria do curso de Agronomia da UFMG.

Aos meus amigos da República Colombiana, República Tulipa's, República das Amoras, ao grupo Az amigas, por todos os momentos compartilhados durante a realização da graduação, momentos nos quais levarei comigo pelo resto da vida. Aos meus colegas de classe pela força.

Ao professor Demerson, por ter cedido o laboratório para realização das análises.

À Laura e Thayná, por terem me ajudado no decorrer do experimento, nas análises, vocês foram muito importantes neste trabalho.

A todos os professores e funcionários do ICA e aqueles que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica.

Agradeço aos professores e pesquisadores da banca examinadora pela atenção e contribuição neste trabalho.

Obrigada a todos que contribuíram para minha formação, crescimento profissional e pessoal.

RESUMO

A espécie *Impatiens balsamina* Linnaeus é pertencente à família Balsaminaceae e apresenta ampla adaptabilidade e grande variedade de cores e formas de flores, conferindo um excelente desempenho paisagístico na composição de jardins. O trabalho teve como objetivo definir a melhor concentração de sais do MS e de sacarose para o crescimento inicial de plântulas de *I. balsamina* e de BAP para a multiplicação *in vitro*. Diferentes concentrações de sacarose (0, 30, 60 g) e dos sais do meio MS (50% e 100%) foram testadas para o crescimento inicial *in vitro* de *I. balsamina*. Para a multiplicação, ápices caulinares foram cultivados em meio MS, com diferentes concentrações de BAP (0, 1, 2, 3, 4 mg/L⁻¹). Os experimentos foram implantados em delineamento inteiramente casualizado. Foram realizadas as avaliações: comprimento da parte aérea, número de raízes, número de folhas e quantidade de plântulas normais para o experimento (1). Número de brotos, número de folhas, comprimento de brotos, comprimento da raiz principal e número de raiz para o experimento (2). Observou-se que para a espécie *I. balsamina*, o meio de cultura MS com 50% dos sais e ausência de sacarose promoveu respostas satisfatórias para as variáveis avaliadas. No segundo experimento a concentração de 3 mg/L⁻¹ de BAP resultou em maior número de brotos. Para número de folhas, comprimento de brotos, comprimento de raiz principal e número de raízes, a ausência de regulador de crescimento foi satisfatório. Conclui-se que a ausência de sacarose e meio de cultivo MS com 50% das concentrações salinas é suficiente para sustentar o estabelecimento *in vitro* e o crescimento inicial de plântulas de *I. balsamina*. A adição de BAP no meio MS é favorável para a indução de brotações em ápices caulinares de *I. balsamina*, mas não é satisfatório para o desenvolvimento das demais características.

Palavras-chave: *Impatiens balsamina*. Meio de cultura. Fitorreguladores. Micropropagação. Indução de brotação.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ápice caulinar utilizadas na segunda parte do experimento, oriundas de sementes.	15
Figura 2 – Exemplificação de uma plântula normal.....	16
Gráfico 1 - Influência da concentração de sacarose e de sais do meio MS no crescimento inicial de plântulas de beijo-de-frade cultivadas in vitro, (A e B) em relação ao número de plântulas normais (PN), (C) comprimento da parte aérea (CPA), (D) número de raízes (NR) e (E) número de folhas (NF).	19
Gráfico 2 - Influência da concentração de BAP em relação ao número de brotações obtidas no cultivo de ápices caulinares de beijo-de-frade aos 30 (A) e 60 dias (B) de cultivo.	20
Gráfico 3 - Influência da concentração de BAP em relação ao número de folhas obtidas no cultivo de ápices caulinares de beijo-de-frade aos 30 (A) e 60 dias (B) de cultivo. .	21
Gráfico 4 - Influência da concentração de BAP em relação ao comprimento de brotos (A) e da raiz principal (B) obtidas no cultivo de ápices caulinares de beijo-de-frade aos 60 dias de cultivo.....	22
Figura 3 – As imagens correspondem aos cinco tratamentos de plantas cultivadas em meio de cultura com diferentes concentrações BAP aos 60 dias.	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAP – 6 – benzilaminopurina

MS – Murashige e Skoog

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 Floricultura Tropical	10
2.2 Beijo-de-frade	11
2.3 Cultura de tecidos: Implicações sobre micropropagação	12
2.4 Meios de cultura.....	13
2.5 Reguladores de crescimento	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Local	14
3.2 Material genético	14
3.3 Tratamentos	14
3.3.1 Condução dos experimentos.....	15
3.4 Avaliações.....	16
3.5 Análise estatística	16
4 RESULTADOS	17
5 DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

O campo da cultura de tecidos vegetais baseia-se na premissa de que as plantas podem ser separadas em suas partes componentes (órgãos, tecidos ou células), que podem ser manipuladas *in vitro* e então cultivadas de volta a plantas completas. Essa idéia de manejar plantas com a facilidade e a conveniência de técnicas da cultura de tecidos tem trazido muitas possibilidades para o estudo e produção de várias espécies vegetais (CAPONETTI; GRAY; TRIGIANO, 2018), incluindo as flores e plantas ornamentais. Para o êxito das técnicas de cultura de tecidos, alguns fatores são fundamentais e devem atender às necessidades fisiológicas da espécie em estudo. Dentre os fatores podemos destacar: meio de cultura, fonte e concentração do carboidrato e aplicação dos reguladores de crescimento (RODRÍGUEZ-FALCÓN *et al.*, 2006; AKSENOVA *et al.*, 2011; DHITAL, 2012; ALVA; OROPEZA, 2013).

Os meios nutritivos utilizados na cultura de tecidos fornecem substâncias essenciais, para o crescimento e desenvolvimento *in vitro*, com algumas modificações para atender as especificações *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas *ex vitro*, são mantidas em material vegetal *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998). Alguns trabalhos tem buscado desenvolver diferentes formulações de meios de cultura na tentativa de se obter meios eficazes e protocolos simplificados (DRONK, 2004; CAMPOS, 2004). Assim como os sais do meio de cultura, a sacarose é outro componente indispensável, pois é fonte de energia exógena para a construção de esqueletos carbônicos em condições *in vitro* (FERREIRA *et al.*, 2002), estando presente em meios de cultura em concentrações variadas.

O crescimento de plantas *in vitro* requer ainda a adição ao meio de cultura de reguladores de crescimento. A indução de brotações *in vitro* está intimamente relacionada com a divisão celular e o crescimento do meristema, sendo as citocininas, a exemplo do BAP (Benzilaminopurina), as responsáveis por essa resposta fisiológica (REIS *et al.*, 2008).

Para diferentes espécies de flores e plantas ornamentais, como orquídeas, roseira, gloxínia, helicônia, copo-de-leite, bromélias, cactáceas, suculentas e outras, a produção *in vitro* já é uma realidade. A planta beijo-de-frade (*Impatiens balsamina*) tem merecido destaque e tem potencial para a produção *in vitro*. A planta é caracterizada pela sua ampla adaptabilidade, uma grande variedade de cores e formas de flores conferindo um excelente desempenho paisagístico compondo jardins. O Beijo-de-frade

tem preferência pela sombra, e se adapta aos mais diversos tipos de recipientes, fato que favorece a popularidade da espécie, contribuindo para que a planta fosse amplamente conhecida e comercializada mundialmente (LIM, 2014).

O interesse em cultivar beijo-de-frade *in vitro* é visando maior eficiência do processo de propagação, pois a produção por cultura de tecidos é uma opção potencial, pois permite alcançar a qualidade desejada, além do considerável aumento do número de plantas dentro de curto espaço de tempo. O cultivo *in vitro* é uma importante ferramenta no processo de propagação de plantas e diante disso, objetivou-se definir a melhor concentração de sais do MS e de sacarose para o crescimento inicial de plântulas de Beijo-de-frade e de BAP para a multiplicação *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Floricultura Tropical

O consumo de flores e plantas ornamentais tem se destacado nos últimos anos, aquecendo desta forma o mercado interno Brasileiro. Hoje podemos encontrar flores e plantas ornamentais bem próximas a nossa casa, em feiras livres, mercados, supermercados e floriculturas, facilitando assim o consumo e a produção de uma diversidade de flores e plantas ornamentais.

A floricultura tropical é uma vertente que está em ascensão no Brasil, e no mundo, por se destacar como uma cultura geradora de renda e fixadora de mão de obra no campo, além de ser uma alternativa para pequenos produtores (LINS; COELHO, 2004). O Brasil possui um conjunto de microclimas favoráveis a produção de diversas plantas ao longo do ano, como orquídeas, bromélias, rosas, suculentas e outras espécies.

As espécies ornamentais tropicais diferem das tradicionais cultivadas por apresentarem características favoráveis a comercialização como a beleza, o exotismo, cores e formas diversas, resistência ao transporte, durabilidade pós colheita, além de grande aceitação no mercado externo (LOGES *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2013). As flores tropicais são apreciadas em arranjos florais, pois apresentam características que compõem a arte floral, o que tem proporcionado um aumento no consumo destas espécies no Brasil e no mundo. Além dos valores estéticos que as flores representam, pode-se citar outros como, valores intelectuais, dados por sua arquitetura, seu perfume;

valores medicinais, valores ecológicos, dados por sua capacidade de purificação do ar, do solo e da água; e valores econômicos, podendo ser utilizadas como enfeites, em jardins e em presentes (SEBRAE, 2013).

No Brasil, existem grandes plantações de flores tropicais, especialmente na região Nordeste, com destaque para os estados de Pernambuco e Alagoas, que já exportam suas flores para outros estados Brasileiros. Em Pernambuco, as espécies cultivadas de flores tropicais, pertencem a família Musaceae, Heliconiaceae, Costaceae, Maranthaceae e Balsaminaceae (LAMAS, 2002). No estado de Minas Gerais, as principais regiões produtoras de plantas ornamentais são: a região de Barbacena, onde encontram-se produtores de rosas, regiões Sul e Central onde encontram-se produtores de crisântemo, na região de Diamantina, onde encontram-se produtores de sempre-vivas. Observa-se que Minas Gerais, também está atuando na produção de flores tropicais, na qual já foram identificados 29 produtores, com produção de antúrio, alpinia, estrelícia, helicônia, sorvetão e zenziber (LANDGRAF, 2009). Dentre as espécies podemos destacar a beijo-de-frade (*Impatiens balsamina*), espécie tipicamente tropical.

2.2 Beijo-de-frade

A espécie *Impatiens balsamina* Linnaeus é uma planta de floração amplamente cultivada e pertence à família Balsaminaceae e nativa da Índia. O Beijo-de-frade é comumente conhecido como bálsamo de jardim, bálsamo de rosa, maria sem vergonha, ciúmes . É uma planta resistente, de dias curtos, floração livre e apresenta porte compacto. Podendo suportar chuvas fortes e alta umidade na atmosfera. A balsamina é uma das espécies mais populares do norte da Índia (LIM, 2014).

As flores são usadas para preparar um corante vermelho (PAL *et al.*, 2018) e usado para pintar as unhas e como cosmético, em substituição ao Henna (*Lawsonia inermis*). O óleo das semente pode ser usado para queima de lâmpadas e na indústria de revestimento de superfícies.

A propagação para *Impatiens balsamina* pode ser realizada de forma sexuada e assexuada. Na propagação sexuada originam-se indivíduos diferentes, com forte presença de variabilidade, o que é importante, uma vez que torna possível a adaptação contínua de uma determinada espécie ao meio. A germinação leva de uma a três

semanas (MACAYA-BERTI, 2015). A espécie também se propaga por partes vegetativas, por exemplo, estacas, o que favorece a regeneração de uma nova planta, idêntica a planta mãe, essa técnica garante uniformidade nas populações.

Sabe-se que essa espécie se propaga com muita facilidade, sendo em alguns casos considerada como planta invasora. Porém, diferente das técnicas convencionais, a muda produzida por cultura de tecidos, permite alcançar a qualidade desejada, pois tem certificada a qualidade genética e fitossanitária, além do considerável aumento do número de plantas dentro de curto espaço de tempo.

2.3 Cultura de tecidos: Implicações sobre micropropagação

A cultura de tecidos tem como principal fundamento a “totipotencialidade” das células, característica indispensável para que ocorra a regeneração de plantas completas, através da divisão celular, crescimento e diferenciação (GAUTHERET, 1985).

A cultura de tecidos tornou-se uma técnica bem estabelecida para cultivar e estudar o comportamento fisiológico de órgãos vegetais, tecidos, células e protoplastos sob condições físicas e químicas controladas. Dentre as técnicas da cultura de tecidos, a micropropagação é uma das aplicações mais importantes da cultura de tecidos vegetais. Ela fornece numerosas vantagens em relação à propagação convencional, como a produção em massa de plantas, livres de doenças, de maneira altamente rápida, independentemente da estação do ano (SHAHZAD *et al.*, 2017).

A micropropagação é uma técnica de cultura de tecidos que possibilita clonar genótipos de interesse. Compreende diferentes etapas que se inicia no estabelecimento da cultura *in vitro*, seguido da multiplicação, alongamento, e enraizamento, etapas que necessitam da utilização de reguladores de crescimento para induzir a resposta fisiológica desejada, finalizando com a etapa de aclimatização da muda (BASTOS *et al.*, 2013).

A micropropagação de plantas ornamentais e sua utilização em âmbito comercial já são realidade em diversos países do mundo, destacando-se Holanda, França, Espanha, Japão e, mais recentemente, o Brasil. Podemos citar alguns exemplos de espécies ornamentais que já podem ser obtidas pelo processo da micropropagação: Ave-do-paráíso, Bastão do imperador, Bromélia, Cactácea, Gladiolo, Gloxínia, Helicônia, Lavanda, Orquídea, Rosa e Tango (PASQUAL; CHAGAS, 2016)

Para que o processo de micropropagação obtenha sucesso é necessário utilizar o meio de cultura adequado para atender às necessidades das culturas e definir o regulador de crescimento que possibilitará uma multiplicação satisfatória.

2.4 Meios de cultura

Os meios nutritivos utilizados para a micropropagação são baseadas em formulações de soluções nutritivas, inicialmente utilizadas para o estudo de nutrição mineral de plantas; por isso fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos, e controlam em grande parte o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998). Geralmente esses meios de cultura são formulados a partir de compostos macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas, agente geleificante e reguladores de crescimento.

Em 1962, o meio MS foi desenvolvido por Murashige e Skoog, que é identificado como meio básico, pois é utilizado na cultura de tecidos na maioria das espécies vegetais, pois vem favorecendo o crescimento e desenvolvimento de várias espécies. A literatura tem mostrado que a utilização de composições salinas menos concentradas, favorece melhores condições, e fornece melhores resultados para algumas espécies. É proposto várias mudanças no padrão das formulações, na tentativa de otimizar o crescimento *in vitro* dessas espécies. Essas mudanças incluem o incremento ou a redução de vitaminas, sacarose e compostos inorgânicos (PASQUAL, 2001).

O crescimento e desenvolvimento dos propágulos *in vitro* são fatores regulados pelas condições de cultivo, meio de cultura e pelo balanço dos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura.

2.5 Reguladores de crescimento

Reguladores de crescimento como auxinas e citocininas são importantes controladores do desenvolvimento vegetal e amplamente utilizados no cultivo *in vitro* (GEORGE *et al.* 2008, WEYERS; PATERSON 2001). O uso das citocininas que é assunto do trabalho, em especial o Benzilaminopurina (BAP) podem contribuir para o aumento da eficiência na produção de mudas e a ampliação dos conhecimentos sobre a fisiologia da espécie em estudo.

A citocinina BAP age induzindo a quebra da dominância apical e proliferação de gemas axilares, promovendo o desenvolvimento da parte aérea. O BAP é a citocinina disponível comercialmente que apresenta os melhores resultados na micropropagação (MOURA et al., 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O trabalho foi conduzido no laboratório de Biotecnologia do Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias (CPCA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) *campus* Montes Claros, durante o período de 25 de outubro de 2017 a fevereiro de 2018.

3.2 Material genético

Foram utilizadas sementes de Beijo-de-frade (*Impatiens balsamina* Linnaeus). As sementes utilizadas foram doadas pela Universidade Federal de Lavras localizada em Lavras, Minas Gerais. As sementes ficaram armazenadas em saco plástico em geladeira (10°C) até a montagem do experimento.

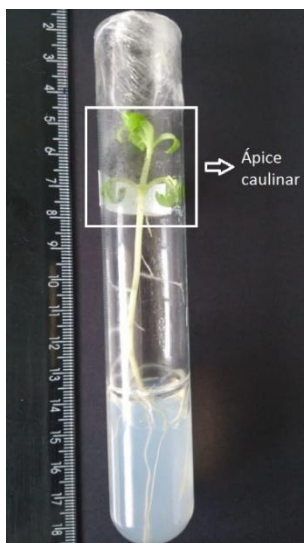
3.3 Tratamentos

Foram instalados dois experimentos:

Experimento I: Crescimento inicial de Beijo-de-frade: influência dos sais do MS e da sacarose: O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em ensaio fatorial 3x2, sendo três concentrações de sacarose (0, 30 e 60 g.L⁻¹) e duas formulações salinas do meio Murashige e Skoog (MS) (1962) (50% e 100%). Os tratamentos foram constituídos de vinte repetições, com uma semente por tubo de ensaio, totalizando 120 parcelas experimentais.

Experimento II: Multiplicação in vitro de Beijo-de-frade: efeito da citocinina BAP: O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, sendo os tratamentos constituídos de cinco concentrações de Benzilaminopurina (BAP): 0; 1; 2; 3 e 4 mg.L⁻¹ para indução de brotações em ápices caulinares de Beijo-de-frade, oriundos de plântulas pré-estabelecidas *in vitro* (Figura 1). Foram utilizadas 13 repetições, sendo um explante por tubo de ensaio.

Figura 1 – Ápice caulinar utilizado na segunda parte do experimento, oriundas de sementes.



Fonte: Da autora, 2018.

3.3.1 Condução dos experimentos

Em todos os experimentos, o meio de cultura MS foi solidificado com 0,7% de ágar, com pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem à 120 °C e 1 atm, por 20 minutos. As culturas foram mantidas em ambiente de cultivo com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 26°C.

Experimento I: Sementes de Beijo-de-frade foram lavadas em água corrente durante 20 minutos, imersas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto e na sequência em hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos, mantendo agitação constante. Em câmara de fluxo laminar, as sementes passaram por tríplice lavagem em água destilada e autoclavada, para retirada dos resíduos dos desinfestantes. Com auxílio de pinça, as sementes foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio contendo 20 mL do meio de cultura, contendo os tratamentos.

Experimento II: Em câmara de fluxo laminar e com o auxílio de bisturi e pinça, ápices apicais foram retirados de plântulas de beijo-de-frade pré-estabelecidas *in vitro*. Os explantes foram colocados individualmente em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio de cultura MS, contendo os tratamentos.

3.4 Avaliações

Após 30 dias foram realizadas as avaliações para o crescimento inicial, com base nas características: Número de plântula normal, comprimento da parte aérea (CPA) (mm), número de raízes (NR) e número de folhas (NF). Foram consideradas plântulas normais, aquelas que apresentaram expansão foliar e desenvolvimento de raízes (Figura 2). Plântulas com crescimento atrofiado da parte aérea ou da raiz primária e ausência de expansão foliar foram consideradas anormais.

Aos 30 e 60 dias foram realizadas as avaliações para multiplicação *in vitro*, com base nas características: número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento de brotos (CB) (cm), comprimento da raiz principal (CRP) (cm) e número de raiz (NR).

Figura 2 – Exemplificação de uma plântula normal.



Fonte: Da autora, 2018.

3.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade, sendo as médias de fator quantitativo comparadas por regressão polinomial. O programa utilizado foi o Sisvar (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS

1º Experimento - Crescimento inicial de Beijo-de-frade: influência dos sais do MS e da sacarose

Para a variável plântula normal houve diferença significativa de forma isolada para os fatores avaliados, concentração de meio de cultura e concentração de sacarose. Para o crescimento inicial de beijo-de-frade *in vitro* em resposta às concentrações dos sais do meio MS pode-se observar a mínima diferença entre os meios, sendo o meio de cultura com 100% dos sais o que apresentou resultado superior em relação ao meio 50% dos sais para a característica número de plântulas normais. Ambos proporcionaram condições adequadas para a germinação e crescimento inicial das plântulas, ou seja, para a formação de parte aérea e raiz (Gráfico 1 A).

Para o gráfico (1 B) a resposta foi linear, observando um declínio na quantidade de plântulas normais à medida que a concentração de sacarose aumenta. Observa-se que a ausência de sacarose é favorável à obtenção de plântulas normais. Enquanto a concentração de 60 mg/L⁻¹ provocou um número muito baixo de plântulas normais. O aumento de sacarose no meio de cultura pode ter alterado o potencial osmótico do meio de cultura e a plântula não respondeu bem à condição oferecida.

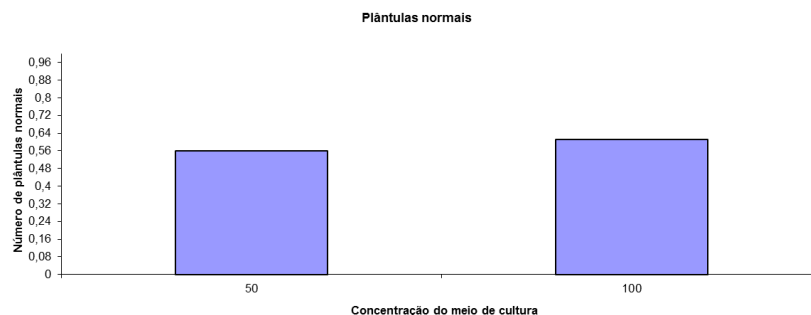
Em relação à variável comprimento da parte aérea houve interação entre os dois fatores avaliados. Observa-se que as duas linhas apresentaram valores similares, contudo o estímulo mais favorável foi obtido quando as plântulas foram cultivadas em meio de cultura contendo 50% dos sais do MS, na ausência de sacarose. Tal variável respondeu de forma inversamente proporcional para o fator sacarose, ou seja, quanto maior a concentração de sacarose, menor foi o comprimento da parte aérea (Gráfico 1 C).

Para número de raízes observa-se pelo gráfico (1 D) que a suplementação do meio até 30 g de sacarose é favorável para a variável número de raízes, observando uma redução dessa variável em concentrações mais elevadas. Verifica-se que na concentração de 30 g de sacarose o número de raízes foi de aproximadamente 14, porém, na ausência de sacarose também se observou um número de raízes satisfatória, de cerca de 8 por plântula.

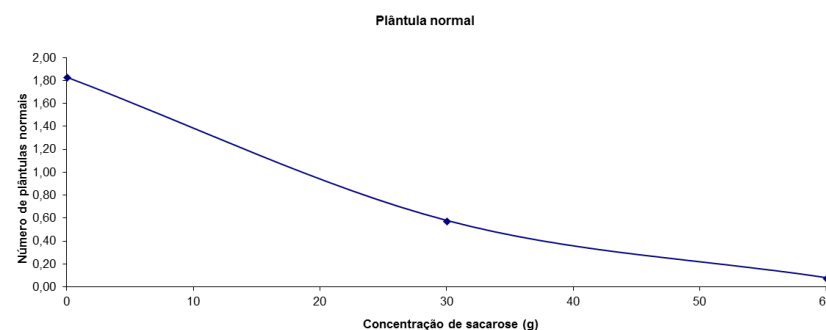
A variável número de folhas apresentou comportamento semelhante ao comprimento da parte aérea, pois também é possível observar que concentrações maiores de sacarose não promoveram à formação de um maior número de folhas. Pelo

gráfico (1 E) pode-se notar que a resposta é linear e diminuiu gradualmente, ou seja, plântulas cultivadas em meio de cultura com ausência de sacarose corresponderam a um maior número de folhas.

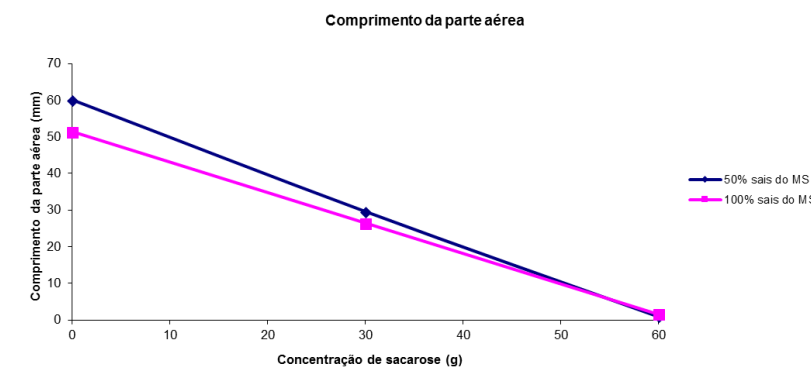
Gráfico 1 - Influência da concentração de sacarose e de sais do meio MS no crescimento inicial de plântulas de beijo-de-frade cultivadas *in vitro*, (A e B) em relação ao número de plântulas normais (PN), (C) comprimento da parte aérea (CPA), (D) número de raízes (NR) e (E) número de folhas (NF).



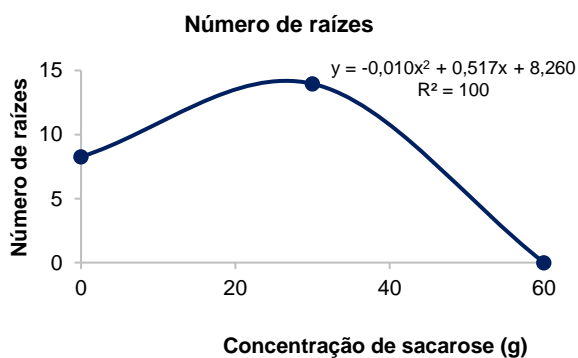
A



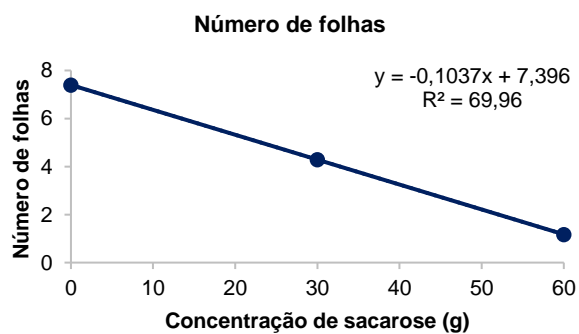
B



C



D

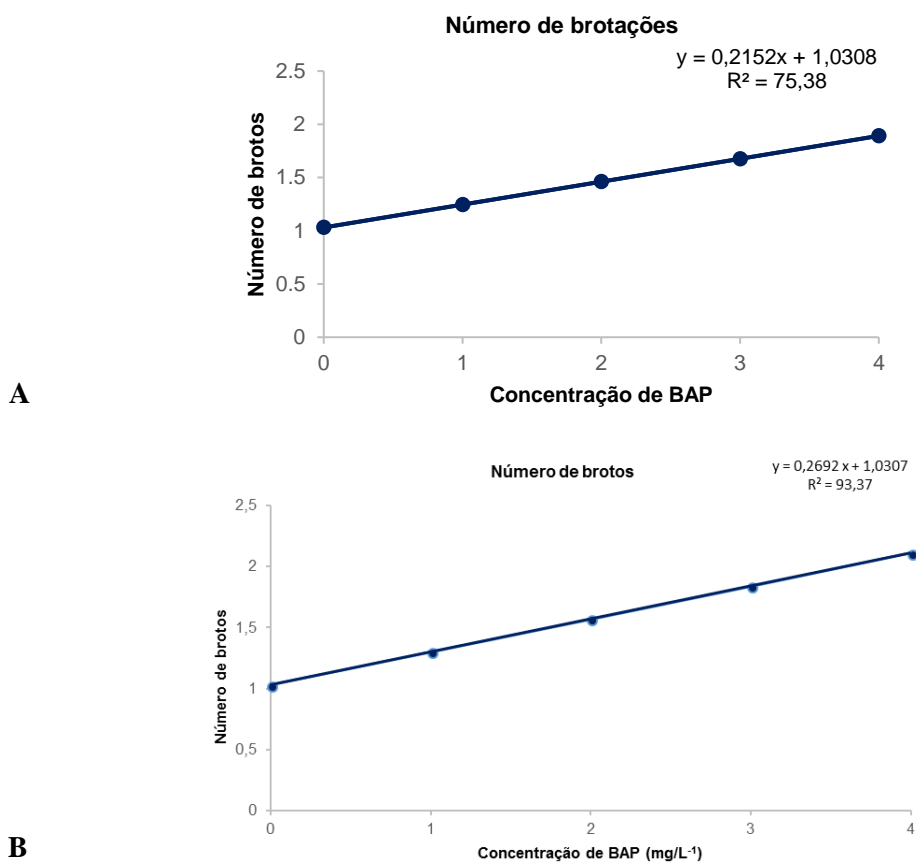


E

2º experimento - Multiplicação *in vitro* de Beijo-de-frade: efeito da citocinina BAP:

Os resultados abaixo mostram as respostas da multiplicação *in vitro* de ápices caulinares de beijo-de-frade em relação a diferentes concentrações de BAP. Pelo gráfico (1 A e B) nota-se uma resposta linear aos 30 e 60 dias após o cultivo, ou seja, o número de brotações apresentou um comportamento crescente e gradual, sem evidências de saturação. Na ausência de BAP observa-se aproximadamente um broto por planta. Observa-se que o aumento da concentração de BAP promoveu à formação de brotações. A maior concentração de BAP deu origem a cerca de dois brotos por explante, mas a ausência de regulador de crescimento no meio de cultura não limitou o desenvolvimento, pois observa a formação de pelo menos um broto por explante.

Gráfico 2 - Influência da concentração de BAP em relação ao número de brotações obtidas no cultivo de ápices caulinares de beijo-de-frade aos 30 (A) e 60 dias (B) de cultivo.

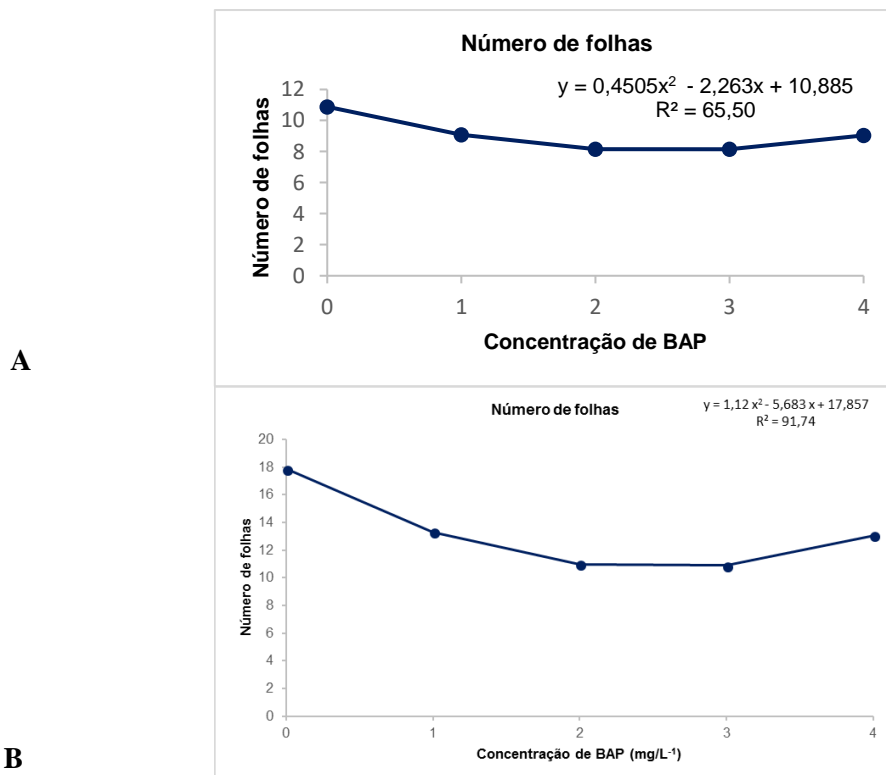


Para número de folhas aos 30 e 60 dias após o cultivo, a resposta foi decrescente, ou seja, a medida que aumentou as doses de BAP, houve redução da variável. Pelo gráfico (2 A e B) pode-se observar que aos 30 dias o número reduziu de onze para oito folhas e aos 60 dias de dezoito para doze folhas por explante.

Os dados indicam que a resposta aos 30 dias é uma parábola invertida. A ausência de BAP induziu a planta a produzir maior quantidade de folhas quando comparado às outras doses de BAP. O número de folhas diminuiu até a dose 3 mg/L⁻¹, observando um leve aumento do número de folhas a partir da concentração 3 mg/L⁻¹ de BAP. No entanto foi uma resposta inferior se for relacionado com a ausência de BAP no cultivo *in vitro* de Beijo-de-frade.

Da mesma forma, a resposta aos 60 dias também foi uma parábola, observa-se que a ausência de BAP proporcionou maior número de folhas, com leve aumento também a partir da dose 3 mg/L⁻¹ de BAP.

Gráfico 3 - Influência da concentração de BAP em relação ao número de folhas obtidas no cultivo de ápices caulinares de beijo-de-frade aos 30 (A) e 60 dias (B) de cultivo.



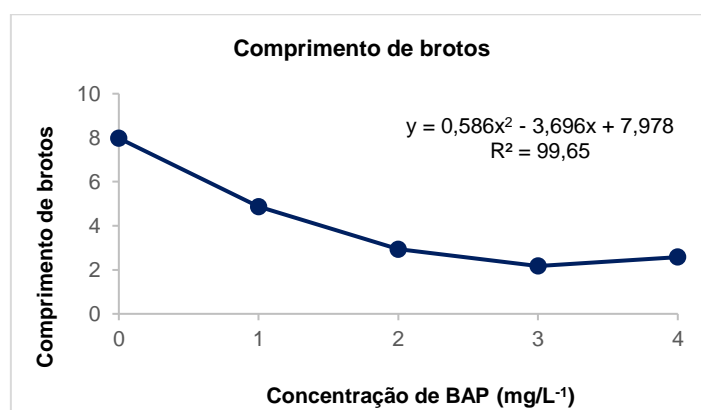
Aos 60 dias de cultivo foram realizadas as avaliações para comprimento de brotos, raiz principal e número de raízes. Pelo gráfico (3 A) observa-se que a ausência de BAP no meio de cultura proporcionou maior comprimento dos brotos, reduzindo com o aumento das concentrações do regulador de crescimento no meio de cultivo. Na ausência de BAP os brotos apresentaram um comprimento aproximado de 8 cm e a redução foi bem acentuada até a concentração de 2 mg.L⁻¹ de BAP, estabilizando a partir desse ponto.

O comprimento da raiz principal apresentou comportamento semelhante e novamente a ausência de BAP foi satisfatória para a variável avaliada. O aumento da concentração até 3 mg.L⁻¹ de BAP já foi o suficiente para inibir o crescimento da raiz principal, chegando próximo de 0 cm (Gráfico 3 B).

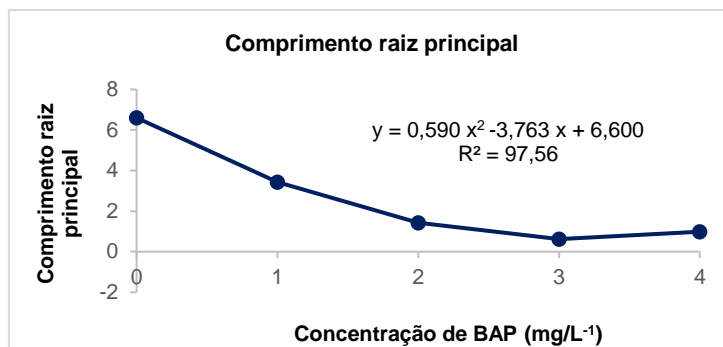
Para número de raízes (Gráfico 3 C) a adição de BAP novamente foi prejudicial, revelando que o maior valor foi obtido na ausência de BAP. Até a concentração de 3 mg/L⁻¹ de BAP a redução foi bem acentuada, observando um leve aumento da variável a partir da concentração citada acima.

Gráfico 4 - Influência da concentração de BAP em relação ao comprimento de brotos (A) e da raiz principal (B) obtidas no cultivo de ápices caulinares de beijo-de-frade aos 60 dias de cultivo.

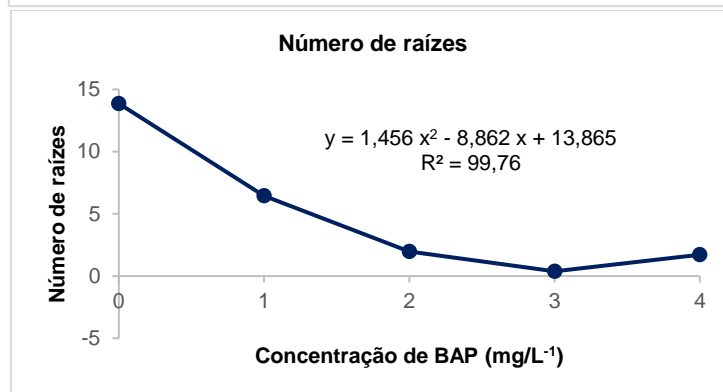
A



B



C



5 DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que concentrações dos sais do meio MS e de sacarose promoveram o crescimento inicial das plântulas e o uso do BAP induziu a multiplicação de beijo-de-frade, podendo ser observado pelo crescimento de plântulas normais, número de folhas e de raízes e do número e comprimento de brotações. Esta conclusão baseia-se nas seguintes evidências: (1) A ausência de sacarose e meio de cultivo MS com 50% das concentrações salinas já é suficiente para sustentar o estabelecimento *in vitro* e o crescimento inicial de plântulas de beijo-de-frade; (2) A suplementação do meio com a citocinina BAP mostrou ser favorável para a indução de brotações em ápices caulinares de beijo-de-frade, mas não é satisfatório para o desenvolvimento das demais características, como número de folhas e raízes, comprimento de brotos e de raiz.

Experimento I - Crescimento inicial de Beijo-de-frade: influência dos sais do MS e da sacarose.

De acordo com as variáveis avaliadas e os fatores testados podemos inferir que a espécie beijo-de-frade não requer um meio de cultura muito completo em termos de

macro e micronutrientes e de uma fonte de carboidrato para sustentar sua germinação e crescimento inicial *in vitro*.

De acordo com Reis *et al.* (2008) para o comprimento da parte aérea na espécie *Melissa officinalis*, o meio MS completo foi o mais satisfatório, seguido do meio MS com 50% dos sais. Esse resultado difere do resultado encontrado no nosso trabalho, já que em relação ao comprimento da parte aérea, o meio MS suplementado com 50% dos sais mostrou ser o mais indicado. Ainda para comprimento da parte aérea, resultados obtidos por Bertozzo e Machado (2010) corroboram com o presente trabalho, uma vez que os autores observaram que para espécies lenhosas o desempenho da variável citada acima foi melhor com a redução de macronutrientes no meio de cultura. Em relação ao efeito da sacarose, diferentemente do presente trabalho, Reis *et al.* (2008) trabalharam com *Melissa officinalis* e observaram que a concentração 1,5% proporcionou melhores resultados para comprimento da parte aérea.

Nunes *et al.* (2008) trabalhando com embriões zigóticos de *Jatropha curcas* verificaram a necessidade da suplementação de sacarose no meio de cultura para promover o comprimento da parte aérea e o número de folhas e raízes em *J. curcas*. Esse resultado não corrobora com os encontrados no trabalho, com exceção do resultado encontrado para número de raízes. A sacarose é um carboidrato que em condições *in vitro* é de fundamental importância, uma vez que a fotossíntese é praticamente nula na condição *in vitro*, sendo a sacarose a fonte de energia disponível para que as culturas possam formar esqueletos carbônicos para sustentar seu crescimento e desenvolvimento.

Observou-se no trabalho que altas concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura podem ter aumentando o potencial osmótico do meio de cultura e então provocado uma maior perda de água pelas plântulas, prejudicando assim o desenvolvimento de plântulas normais. Segundo Neto e Otoni (2003), a contribuição osmótica da fonte de carboidrato (sacarose) tem relação inversa com a concentração da fonte de carbono.

Experimento II: Multiplicação *in vitro* de Beijo-de-frade: efeito da citocinina BAP.

Pelos resultados encontrados no presente trabalho podemos inferir que a adição de uma citocinina no meio de cultura para multiplicação é essencial, porém, as concentrações utilizadas devem atender às necessidades da planta. Nossos resultados mostram que para a indução de brotações se faz necessário o uso do BAP, mas é

recomendado testar novas concentrações que possam contribuir para o crescimento *in vitro* das brotações obtidas. Observou-se diferença significativa para número médio de brotos por explante aos 30 e 60 dias, com melhor resposta na concentração de 4 mg/L⁻¹.

O BAP é uma citocinina sintética frequentemente utilizada na micropropagação. Na literatura é possível encontrar resultados que mostram sua eficiência na multiplicação de partes aéreas e na indução de gemas adventícias. O trabalho mostra que o aumento das concentrações de BAP é proporcional ao número de brotações. Resultados semelhantes foram encontrados por Jardim *et al.* (2010) que trabalharam com Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) em meio de cultura MS acrescido de 4,0 mg.L⁻¹ de BAP, onde os autores obtiveram quantidades satisfatórias de brotações. Mas resultados diferentes foram encontrados por Gutiérrez *et al.* (2011) que trabalharam com pata-de-vaca (*Bauhinia cheilantha*) em meio de cultura WPM, suplementado com 1,5 mg.L⁻¹ de BAP e verificaram maior número de brotos.

Aos 30 e 60 dias após o cultivo foi possível observar que as características número de folhas e raízes e comprimento de brotos e raízes não foram favorecidos com a adição de BAP, sendo a ausência de BAP o melhor tratamento para promover tais características. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o alongamento do broto pode ser inibido pelo efeito acumulativo do regulador de crescimento presente no meio, no caso desse trabalho o BAP. O mesmo resultado foi observado por RODRIGUES *et al.*, (2013) trabalhando com induções de brotações *in vitro* da espécie *Physalis peruviana* L. onde verificaram maior comprimento de brotos na ausência do regulador de crescimento. Feitosa *et al.* (2015) trabalharam com *Hyptis pectinata* e também observaram que o cultivo em meio MS sem o regulador de crescimento BAP é o mais adequado para promover o crescimento e desenvolvimento das brotações.

No presente trabalho não foi utilizado auxina, somente a citocinina BAP e mesmo na ausência desta verificou-se a formação significativa de raízes nos ápices caulinares de beijo-de-frade cultivados em meio para multiplicação (Figura 3).

Figura 3 – As imagens correspondem aos cinco tratamentos de plantas cultivadas em meio de cultura com diferentes concentrações BAP aos 60 dias.



Fonte: Do autor, 2018.

Estudos demonstram que a interação de citocinina exógena com auxina endógena (hormônio natural produzido pela planta) ajudam a promover a indução de raízes (TORRES; CALDAS; BUSO, 1999). Outro ponto que também podemos abordar é que algumas espécies em condições *in vitro* não necessitam do estímulo exógeno de reguladores de crescimento para induzir uma resposta fisiológica e podemos inferir que a espécie em estudo apresenta tal competência.

6 CONCLUSÃO

A ausência de sacarose e meio de cultivo MS com 50% das concentrações salinas é suficiente para sustentar o estabelecimento in vitro e o crescimento inicial de plântulas de beijo-de-frade.

A suplementação com BAP é favorável para a indução de brotações em ápices caulinares de beijo-de-frade, mas não é satisfatório para o desenvolvimento das demais características, como número de folhas e raízes, comprimento de brotos e de raiz.

REFERÊNCIAS

ALVA, S.; OROPEZA, M. Effect of culture médium consistence and silver nitrate on micropropagation of two potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Colombia, v. 15, p; 55-62, 2013.

AKSENOVA, N. P.; KONSTANTINOVA T. N.; GOLYANOVSKAYA S. A.; SERGEEVA, L. L.; ROMANOV G. A. Hormonal regulation of tuber formation in potato plants. **Journal of Plant Physiology**, Russia, v. 59: p. 451-466, 2011.

BASTOS, S. M. S. L.; SANTOS, A. G.; CEOLIN, A. C.; SILVA, S. S. L.; LOGES, V. Flores tropicais: Um estudo com consumidores e lojistas no estado de Pernambuco. In: **Jornada de ensino**, pesquisa e extensão, 2013, Recife. UFRPE.

BERTOZZO, F.; MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis L.*) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, nov. 2010.

CALDAS, L. S.; PADMAJA, H.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, EMBRAPA-CNPQ, p. 87-132, 1998.

CAMPOS, D. M. Cultura *in vitro* simplificada. **O Mundo das Orquídeas**, São Paulo, n.36, p. 52- 53, 2004.

CAPONETTI, J. D.; GRAY, D. J.; TRIGIANO, R. N. History of plant tissue and cell culture. In: _____. (Org). **Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises**, 2. ed. 2018.

DHITAL, S. P.; LIM, H. T. Microtuberization of potato (*Solanum tuberosum L.*) as influenced by supplementary nutrientes, plant growth regulators. **Potato Research**, v. 55, p. 97-108, 2012.

DRONK, A. G. **Meios de cultura e condições de luminosidade para o cultivo *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Linden & Rchib.f.** Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso e Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

FEITOSA, R. B.; SANTOS, M. C.; SANTOS, M. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F. Micropropagação e aclimatização de acessos de *hyptis pectinata*. **Plant Cell Cult. Micropropag.**, Lavras, v.11, n.1, p. 1-9, 2015

FERREIRA, FURTADO D. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, M. G. R.; CÁRDENAS, F. H. N.; CARVALHO, C. H. S. C.; CARNEIRO, A. A.; DANTAS FILHO, C. F. Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 246-248, 2002.

GAUTHERET, R. J. Sur la culture d'extrémités de racines. C. R. Soc. Biol. v. 109, p. 1236-1238, 1985.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. Plant propagation by tissue culture. **Springer**, Eversley, p. 709, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.183-260.

GUTIÉRREZ, I. E. M. *et al.* Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, v. 41, p. 260-265, 2011.

JARDIM, L.S. *et al.* Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, Amazonas, v. 40, p. 275-280, 2010.

LAMAS, A. M. Floricultura Tropical: Técnicas de Cultivo. SEBRAE – Pernambuco, 2002.

LANDGRAF, P. R. C.; PAIVA, P. D. O. Produção de flores cortadas no estado de Minas Gerais. **Rev. Ciência e Agrotecnologia**. Lavras – MG, v. 33, n. 1, p. 120-126, jan.-fev., 2009.

LIM, T. K.; Impatiens balsamina. In: Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants, Springer, Dordrecht, p. 537-547, 2014.

LINS, S. R. O.; COELHO, R. S. B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**. Pernambuco, v. 29, p. 332-335, 2004.

LOGES, V.; TEIXEIRA, M.C. F.; CASTRO, A.C.R.; COSTA, A.S. Colheita, pós-colheita e embalagem de flores tropicais em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.3, p.699-702, jul-set 2005.

MACAYA-BERTI, J. Impatiens balsaminácea cultivados em Chile. *Chloris Chilensis*, 2015

MOURA, L. C.; TITON, M.; FERNANDES, J. S. C.; SANTANA, R. C.; OLIVEIRA, M. L. R. Micropropagação de Sucupira-preta por meio de gemas axilares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 12, p. 1691-1698, 2012.

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

- NETO, V.B. de P.; OTONI, W.C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? **Scientia Horticulturae**, 97, p. 193-202, 2003.
- NUNES, C.F. et al. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão manso. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.43, n.1, p.9-14, 2008.
- PAL, S.; SINGH, A. K.; SISODIA, A.; PAL, A. L. and Twiari, A. Evaluation of double whorled balsam (*Impatiens balsamina* L.) genotypes for growth, flowering and seed attributes. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, p. 2901-2904, 2018.
- PASQUAL, M.; CHAGAS, E. A. Cultura de tecidos em espécies ornamentais. 1. ed. Boa Vista: UFRR, 2016. 350 p.
- PASQUAL, M. Meios de cultura. In: PASQUAL, M. Cultura de tecidos vegetais. Lavras-MG: UFLA/FAEPE, v.1, 74p, 2001.
- REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, v.55, p.160-167, 2008.
- RODRIGUES, F. A.; PENONI, E. D.; SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M. Diferentes concentrações de sais do meio MS e BAP na multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. Uberlândia, v. 29, n. 1, p. 77-82, janeiro, 2013.
- RODRÍGUEZ-FALCOM, M.; BOU, J., & PRAT, S. Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 151-180, 2006.
- SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Floricultura. Disponível em: Acesso em 24 jul. 2013. Acesso em 7 de jun. 2018.
- SHAHZAD, A.; SHARMA, S.; PARVEEN, S.; SAEED, T.; SHAHEEN, A.; AKHTAR, R.; YADAV, V.; UPADHYAY, A.; AHMAD, Z. Historical Perspective and Basic Principles of Plant Tissue Culture. **Plant Biotechnology: Principles and Applications**, p. 1-36, 2017.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA, v.2, p. 354, 1999.
- WEYERS, J. D. B.; PATERSON, N. W. Plant hormones and the control of physiological processes. **New Phytologist**, v. 152, p. 375-407. 2001