

**Micropropagação da figueira (*Ficus carica* L.)
'Roxo de Valinhos'**


GRAZIELLA RIBEIRO BRUM

2001

GRAZIELLA RIBEIRO BRUM

MICROPROPAGAÇÃO DA FIGUEIRA (*Ficus carica* L.)
'ROXO DE VALINHOS'

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".



Orientador
Prof. Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS
2001

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Brum, Graziella Ribeiro

Micropropagação da figueira (*Ficus carica* L.) 'Roso de valinhos' / Graziella Ribeiro Brum. --Lavras : UFLA, 2001.

43 p. : il.

Orientador: Moacir Pasqual.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Figueira. 2. Micropropagação. 3. Enraizamento. I. Universidade Federal de

Lavras. II. Título.

CDD-634.373

GRAZIELLA RIBEIRO BRUM

**MICROPROPAGAÇÃO DA FIGUEIRA (*Ficus carica*L.)
'ROXO DE VALINHOS'**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

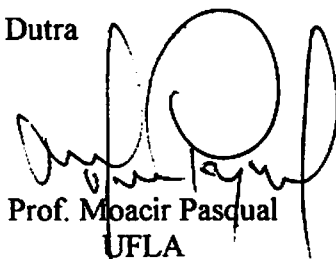
APROVADA em 14 de agosto de 2001.

Prof. Nilton Nagib Jorge Chalfun

UFLA

Pesq. Leonardo Ferreira Dutra

UFLA



Prof. Moacir Pasqual
UFLA
(Orientador)

LAVRAS

O melhor possível

Se você não puder ser um pinheiro no topo da colina,
Seja uma pequena árvore no meio do vale;
Mas seja a melhor árvore à margem do regato
Se não puder ser árvore,
Seja um ramo.
Se não puder ser um ramo,
Seja um pouco de relva
E dê alegria aos que passam no caminho.
Não podemos ser todos comandantes;
Temos de ser soldados.
Mas há um lugar para todos nós.
Existem grandes e pequenas obras
E sempre há uma tarefa que devemos realizar.
Se não puder ser uma estrada real,
Seja uma simples vereda.
Se não puder ser Sol,
Seja uma pequena estrela.
Mas seja o melhor que lhe for possível. (Douglas Malloch)

Aos meus pais, Martha e Cláudio, que mesmo estando a distância, são fontes inesgotáveis de força, incentivo e amizade.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de toda existência e sabedoria.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de realização do Curso e pelas alternativas oferecidas no transcorrer do mesmo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Moacir Pasqual pela orientação e amizade durante a execução deste trabalho.

Aos colegas Adriano Bortolotti e Leonardo Ferreira Dutra pela infinita colaboração na realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA, Antônio Claret, Vantuil e Evaldo, pela colaboração na condução dos meus experimentos.

Aos colegas de Pós-Graduação, a minha amizade e respeito, pelos momentos de troca de conhecimentos e alegria.

Aos meus irmãos e cunhadas pelo carinho, presença e apoio.

A todos aqueles que, de perto ou de muito longe, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 Introdução.....	01
2 Referencial Teórico.....	03
2.1 Botânica e Cultivares.....	03
2.2 Micropropagação da Figueira.....	05
2.3 Meios Nutritivos.....	08
2.4 Reguladores de Crescimento.....	12
3 Material e Métodos.....	15
3.1. Efeito de diferentes meios nutritivos associados a várias concentrações de sacarose na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Ficus carica</i> L.....	16
3.2 Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na multiplicação <i>in vitro</i> da figueira (<i>Ficus carica</i> L.).....	16
3.3 Efeito de diferentes concentrações de AIB associadas a diferentes concentrações dos sais do meio de cultura WPM no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>Ficus carica</i> L.....	16
4 Resultados e Discussão.....	18
4.1 Efeito de diferentes meios nutritivos associados a várias concentrações de sacarose na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Ficus carica</i> L.....	18
4.2 Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na multiplicação <i>in vitro</i> da figueira (<i>Ficus carica</i> L.).....	24
4.3 Efeito de diferentes concentrações de AIB associadas a diferentes concentrações dos sais do meio de cultura WPM no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>Ficus carica</i> L.....	31
5. Conclusões.....	36
6. Referências Bibliográficas.....	37

RESUMO

BRUM, Graziella Ribeiro. Micropropagação da figueira (*Ficus carica* L.) 'Roxo de Valinhos'. Lavras-MG UFLA, 2001. 41p. (Dissertação-Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)*.

O trabalho teve como objetivo verificar o comportamento de segmentos nodais de *Ficus carica* L. 'Roxo de Valinhos' em diferentes meios de cultura associados a concentrações de sacarose e dos fitorreguladores BAP, ANA e AIB. Explantes estabelecidos em laboratório foram inoculados em condições assépticas para tubos de ensaio contendo os meios de cultura e mantidos em sala de crescimento com $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $35\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa. Foram instalados três experimentos e após 8 semanas avaliaram-se o comprimento da maior raiz e parte aérea, número total de brotos, número total de brotos maiores que 1cm, peso da matéria fresca da raiz e da parte aérea. No primeiro experimento utilizaram-se os meios MS, Knudson, WPM, White e B5, associados a quatro diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Maior comprimento e peso da matéria fresca da parte aérea e número de brotações foram obtidos no meio básico WPM acrescido de 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose. No segundo experimento utilizaram-se cinco diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1; 2; 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) associadas a quatro concentrações de ANA (0; 0,05; 0,1; 0,2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), em meio WPM acrescido de 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose. Os melhores resultados para comprimento de raízes e parte aérea, maior número de brotos e brotos maiores que 1 cm foram observados quando se utilizou BAP na concentração de 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ na ausência de ANA. O aumento da concentração de ANA resultou na diminuição das características avaliadas. No terceiro experimento variaram-se as concentrações de sais do meio WPM (0; 25; 50; 100; 200%), associando-as a quatro concentrações de AIB (0; 1; 2; 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Maiores comprimentos da maior raiz e parte aérea foram observados no tratamento em que se utilizou 0% da concentração de sais do meio WPM suplementado com 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB; para número total de brotos, observou-se melhor desenvolvimento em meio de cultura com concentração de 100% de WPM, na ausência de AIB; para peso da matéria fresca da raiz e parte aérea, os melhores resultados foram observados em meio com 0% da concentração de sais do meio WPM, também na ausência de AIB.

* Orientador: Moacir Pasqual - UFLA

ABSTRACT

BRUM, Graziella Ribeiro. Micropropagation of fig *Ficus carica* L. 'Roxo de Valinhos'. Lavras: UFLA, 2001. 41p. (Dissertation-Master Program in Agronomy/Crop Science)*.

Ficus carica L. 'Roxo de Valinhos' in different culture medium associated to several sucrose and growth regulators BAP, NAA and IBA concentrations were studied. Nodal segments with two buds were aseptically inoculated in test tubes containing the culture medium and transferred to growth room with $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ and $35\mu\text{M.m.s.}^{-1}$ light intensity. Root and aerial part length, total sprouts number, sprouts number larger than 1 cm, root and aerial part fresh matter weight were evaluated after 8 weeks. In the first experiment MS, Knudson, WPM, White and B5 culture medium associated to four different sucrose concentrations (0, 15, 30 and 45 g.L^{-1}) were used. Higher aerial part length and fresh matter weight and total sprouts number were obtained with WPM medium added sucrose 15 g.L^{-1} . In the second experiment five different BAP concentrations were used (0; 0,5; 1; 2; 4 mg.L^{-1}) each one associated to four NAA concentrations (0; 0,05; 0,1; $0,2\text{ mg.L}^{-1}$). The material was inoculated in half strength WPM salts and sucrose 15 g.L^{-1} . The best results for roots and aerial part length, total sprouts number and sprouts number larger than 1 cm were observed when BAP was used at 2 mg.L^{-1} in NAA absence. In the third experiment WPM salts concentrations (0; 25; 50; 100; 200%) were associated with four IBA concentrations (0,0; 1; 2; 4 mg.L^{-1}). Best results of root and aerial part length were observed in WPM salts absence added with IBA 2 mg.L^{-1} . Better development of total sprouts number was observed in WPM salts 100% concentration and IBA absence. Higher root and aerial part fresh weight were observed in WPM and IBA absence.

* Major Professor: Moacir Pasqual – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior exportador de figos do mundo, aproximadamente 800 toneladas, perdendo apenas para a Turquia, que exporta cerca de 40.000 toneladas.

Na América do Sul, o Brasil é o maior produtor de figos, destacando-se São Paulo como o maior produtor. Em 1996, havia 400 mil plantas, distribuídas em 256 ha, sendo 70% deste total encontrados em Valinhos, 20% em Campinas e 10% em outros municípios da circunvizinhança. A ficicultura nestas regiões está direcionada à produção de frutas para consumo "in natura", tanto para o mercado interno como para exportação. O Rio Grande do Sul, em especial as regiões de Gramado e Nova Petrópolis, também explora a cultura de figueira, cujos frutos destinam-se ao consumo "in natura" e à industrialização, utilizando figos verdes.

Minas Gerais, com uma produção da ordem de 1.200 toneladas, vem se destacando como terceiro maior produtor brasileiro de figos. Há cerca de 216 ha com figueiras, incluindo plantas novas em formação e adultas em produção. As principais regiões produtoras estão localizadas no Sul e Sudoeste do Estado.

A fruticultura de clima temperado sempre foi dita como potencial em Minas Gerais, estado no qual, desde meados da década de 70, tem-se trabalhado no sentido de introduzir e selecionar variedades mais adaptadas às condições ecológicas do Estado.

Em Minas Gerais, a figueira é cultivada exclusivamente para a produção de figos verdes, cujo destino é a industrialização, na forma de figo cristalizado. A carência de frutas para a industrialização tem elevado os preços do produto, incentivando o surgimento de programas de cultivo, bem como de iniciativas particulares.

Um dos requisitos para elevada produtividade e longevidade dos pomares é o uso de mudas de alta qualidade. Para que estas mudas sejam produzidas dentro dos padrões exigidos por lei e possuam preços competitivos, é muito importante a otimização do sistema, aumentando a capacidade de produção dos viveiros e reduzindo o custo unitário da muda.

Convencionalmente, a figueira é propagada assexuadamente através da estaquia, em que segmentos destacados da planta mãe são colocados sob condições adequadas e, formando raízes adventícias, originam uma nova planta idêntica àquela que lhe deu origem (Válio, 1986). Comercialmente, no Brasil, a produção direta de mudas de figueira através de estacas tem sido o processo de propagação mais utilizado (Silva, 1983). Embora seja uma técnica que pode proporcionar elevados percentuais de enraizamento, a estaquia acarreta intenso uso de mão de obra, contribuindo para a elevação do custo da muda, além de disseminar doenças (como vírus e fungos e nematóides), reduzindo a qualidade final da muda.

A sua multiplicação através da cultura de tecidos, ou micropropagação, pode constituir um método auxiliar na produção eficiente de mudas de figueira com alta qualidade fitossanitária e genética. Esta técnica vem sendo utilizada com sucesso para a obtenção de mudas sadias em grande número de espécies economicamente importantes ou com dificuldade de propagação, realizando avanços importantes nos campos de genética, fisiologia e patologia (Paiva, 1998).

No entanto, para a cultura da figueira, são raros os trabalhos realizados in vitro, conhecendo-se muito pouco sobre seu comportamento, bem como sobre seu posterior desenvolvimento no viveiro ou no pomar (Guerra e Costa, 1988).

Estabeleceu-se o presente trabalho com o objetivo de estudar a multiplicação e o enraizamento *in vitro* da cultivar Roxo de Valinhos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Botânica e Cultivares

/ A figueira cultivada no Brasil pertence à família Moraceae. Nesta família predominam indivíduos com hábito de crescimento arbóreo ou arbustivo, sendo rara a presença de herbáceas. / É composta de cerca de 61 gêneros com mais de mil espécies. No Brasil encontram-se várias destas espécies, algumas selvagens, outras cultivadas. / O maior gênero da família é o *Ficus*, com cerca de 600 espécies /

As árvores são de porte médio a grande. No Brasil, devido às técnicas de manejo empregadas na cultura, estas plantas não ultrapassam o porte arbustivo (3 metros). Seu sistema radicular é superficial e fibroso, o número de ramos é variável (6-24) e depende exclusivamente do objetivo de exploração e do sistema de condução adequado (Maiorano et al., 1997).

As folhas são caducas, grandes, lobuladas, sendo suas características de tamanho, forma, cor, textura e pecíolo utilizadas para diferenciação varietal (Pereira, 1981).

As flores se desenvolvem dentro de um receptáculo denominado sincônio, que nada mais é do que o próprio fruto.

A fruta da figueira, na verdade, é uma infrutescência, visto que não é originária do ovário, e sim um pequeno aquênio que se forma pelo desenvolvimento deste.

A fruta é grande, periforme, alongada, tem pedúnculo curto, coloração externa roxo-escuro, coloração da polpa, na cavidade central, rosa-violácea; e quando madura é tenra e saborosa. /

Existem cerca de 25 cultivares de figueira no Brasil, sendo que apenas a cultivar Roxo de Valinhos é explorada comercialmente, que foi introduzida no Brasil, em Valinhos-SP, por um imigrante italiano. É uma cultivar rústica, vigorosa e produtiva, com boa adaptação a diversos climas e adaptada ao sistema de poda drástica.

Em outros países, a cultivar 'Roxo de Valinhos' é conhecida como 'Nero', 'Corbo', 'Brown Turkey', 'Granata' e 'San Piero' (Rigitano, 1964).

Tomando por base as características florais e os hábitos de frutificação, Rigitano (1964), descreve quatro tipos principais de figo:

Caprifigos (*Ficus carica silvestres*): Constituem o tipo selvagem, do qual se originaram os outros três tipos de figos cultivados. São raras as variedades que apresentam valor comestível. É a única classe de figo cujas flores femininas apresentam, quando maduras, estames fornecedores de pólen às demais variedades. São também os únicos figos, cujas flores femininas apresentam estilos curtos, apropriados à ovoposição e ao desenvolvimento da vespa do gênero *Blastophaga*. No Brasil, devido a inexistência da vespa *Blastophaga psenes*, os caprifigos existem apenas em coleções experimentais.

Smirna (*Ficus carica smyrniaca*): Os figos deste tipo produzem somente flores femininas com estilo alongado e a sua maturação não se verifica, a menos que receba estímulo da polinização. Sem esse estímulo, os figos vão minguando e geralmente caem imaturos.

Comuns (*Ficus carica hortensis*): Os figos deste tipo não necessitam de qualquer tipo de estímulo produzido pela polinização para que amadureçam. Apresentam, do mesmo modo dos figos tipo smirna, flores femininas com estilo longo, porém são capazes de se desenvolver por partenocarpia, nesse caso, formam sementes estéreis. Aos figos deste tipo pertence a variedade 'Roxo de Valinhos'.

São Pedro (*Ficus carica intermédia*): São os figos com características intermediárias entre os figos Smirna e os Comuns. Apresentam também somente flores femininas, com estilo longo; entretanto, os figos da primeira colheita são partenocárpicos, já os da segunda colheita necessitam da caprifigação para que cheguem a amadurecer.

2.2 Micropropagação da figueira

Comercialmente, a propagação de figueira no Brasil é realizada através da estaquia (Silva, 1983). A estaquia é um método em que segmentos destacados da planta mãe são colocados em condições adequadas que, formando raízes adventícias, originam uma nova planta. É um método que demanda tempo, mão-de-obra e considerável espaço físico, além das plantas ficarem expostas à contaminação por nematóides, vírus e fungos, reduzindo a qualidade final da muda e onerando o seu custo de produção (Yui, 1990). Por outro lado, avanços no plantio de pomares implicam na necessidade de produção de mudas de alta quantidade e baixo custo, o que requer o uso de métodos intensivos de propagação (Corrêa, 1990 e Yui, 1990).

A micropropagação, ou propagação vegetativa *in vitro*, pode ser útil tanto na produção de plantas matrizes (cepas) quanto na produção direta de porta-enxertos e de mudas das cultivares-copa sem enxertia. Esta técnica proporciona rápida multiplicação a partir de matrizes sadias, as quais são obtidas por cultura de meristemas e, portanto, são isentas de viroses (Corrêa, Pasqual e Yui, 1991). Plantas matrizes livres de vírus são fundamentais para obtenção de mudas de boa qualidade. Através da cultura de meristemas, pode-se obter matrizes sadias com garantia de estabilidade genética (Ribas e Zanette, 1992).

em referência
C. L. 10.10.10.10

A técnica de cultura de tecidos de plantas tem sido de grande utilidade na resolução de diversos problemas de várias culturas agrônomicas. É uma importante estratégia para o melhoramento, clonagem e multiplicação de plantas em larga escala e para obtenção de plantas livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e genética. Além do controle efetivo de doenças, apresenta também facilidade no manuseio e transporte, independência da sazonalidade e utilização de pequenas porções da planta para produção em larga escala comercial.

Especificamente no cultivo da figueira, poucos são os trabalhos realizados em cultivo *in vitro*. Pouco se sabe sobre o comportamento *in vitro* da espécie e do posterior desenvolvimento das plantas no viveiro ou pomar (Guerra e Costa, 1988).

Barbosa et al. (1992) desenvolveram trabalhos visando a produção de mudas da figueira 'Roxo de Valinhos' através do cultivo *in vitro* de meristemas. Os resultados apresentados confirmam a possibilidade da propagação *in vitro* da figueira. Entretanto, há necessidade de otimização do protocolo de propagação, especialmente quando na fase de enraizamento, associando-a ao uso de fitorreguladores (AIB, ANA, BAP e outros).

A propagação vegetativa é essencial para a manutenção dos caracteres agrônomicos desejáveis do genótipo, essencialmente em porta-enxertos de origem clonal.

Murashige e Skoog (1974) apresentaram um esquema padrão, representando os estágios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*:

Estágio I: Seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas;

Estágio II: Multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação;

Estágio III: Transferência das partes aéreas produzidas, para meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para substrato ou solo.

Às vezes um estágio zero é citado, o qual corresponde ao tratamento dado à planta matriz, de onde são retirados os explantes (Torres, Caldas e Buso, 1998).

Atualmente, a maior importância da atividade da micropropagação está na obtenção de plantas livres de vírus, isto é, na produção de mudas de lenhosas, herbáceas e arbustivas. No trabalho *in vitro* com figueira, o objetivo se restringe à produção de plantas livres de vírus, através do alongamento dos ápices caulinares (Murithi, Ragan e Waite, 1982; Pontikis e Melas, 1986). Para os sistemas de certificação de mudas frutíferas, a limpeza clonal e a micropropagação são indispensáveis. De modo geral, a micropropagação das espécies lenhosas é mais difícil quando comparada à das espécies herbáceas, devido à perda da capacidade morfogenética de seus tecidos.

Espécies frutíferas, como a macieira, pereira, videira e citros, vêm tendo significativos progressos na área da micropropagação, o mesmo ocorrendo com espécies ornamentais, tais como samambaias, crisântemos, orquídeas violetas e florestais, especialmente no caso do eucalipto.

2.3 Meios Nutritivos

Os meios de cultura, por constituírem parte essencial da cultura de tecidos, têm evoluído juntamente com a própria ciência da biotecnologia.

Inicialmente, foram utilizados os mais diferentes tipos de meios e componentes, até o estabelecimento do meio 'MS' de Murashige e Skoog (1962). Este meio contém 40 mM de NO_3^- e 20 mM de NH_4^+ e o crescimento das células e tecidos das plantas está relacionado à alta concentração de amônia e nitrato. Usa-se também o meio básico WPM (Wood Plant Medium) de Loyd e McCown (1980), que foi desenvolvido para cultura de brotações em plantas lenhosas e apresenta $\frac{1}{4}$ das concentrações de NO_3^- e NH_4^+ do meio MS, além de mais potássio e um alto nível de ions sulfato. O meio básico B5, desenvolvido por Gamborg, Miller e Ojima (1968), apresenta níveis elevados de NO_3^- e K^+ e baixos de NH_4^+ , em concentrações superiores a 2 mM de NH_4^+ . Também se usa o meio básico Knudson, modificado por Ardite (1967), e o meio básico White (1943).

Entretanto, para cada tipo de espécie, cultivar e explante, o meio mais adequado e eficiente é variável. A extrapolação pura e simples em geral não traz os melhores resultados. Para determinar qual o melhor meio para cada caso, deve-se recorrer a diversos ensaios.

O meio de cultura deve suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com nutrientes necessários ao crescimento. Basicamente, o meio de cultura fornece não só macro e micronutrientes, mas também carboidratos (normalmente a sacarose) para substituir o carbono que a planta normalmente fixa na atmosfera pela fotossíntese. Para proporcionar melhor desenvolvimento, normalmente incluem-se certos componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento. Diversos outros produtos, a exemplo de sucos de frutas, leite de coco, extratos de leveduras e proteínas hidrolisadas, foram usadas

no passado, substituindo vitaminas e aminoácidos ou mesmo como suplementos adicionais. Como é importante que o meio seja o mesmo todas as vezes que for preparado, componentes que podem variar em sua composição devem ser evitados, mesmo que proporcionem resultados positivos (Pasqual, Hoffmann e Ramos, 1997).

Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese dos compostos orgânicos necessários para o crescimento das células além de atuarem como um componente osmótico do meio de cultura (Torres, Caldas e Buso, 1998).

Murashige e Skoog (1974) afirmam que vários carboidratos têm sido usados, mas não têm mostrado superioridade sobre a sacarose, que suporta as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies. Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos sobre a entrada e o metabolismo de sacarose *in vitro*. Alguns autores relatam que a sacarose é hidrolisada em glicose e frutose gradualmente no meio, pela ação da enzima invertase localizada na parede celular (Kozai, 1991). A atividade biológica de qualquer substância não somente varia com a dosagem, mas depende do meio no qual é colocada (Murashige e Skoog, 1962). Portanto, a concentração de sacarose é um fator importante para obter crescimento satisfatório, dependendo do meio e do explante. A concentração mais utilizada é a de 3% (p/v). Observou-se um aumento na taxa de fotossíntese quando, em subculturas sucessivas, a concentração de sacarose foi reduzida de 20 ou 40 g.L⁻¹ para 10 g.L⁻¹. A concentração de sacarose afeta a assimilação de nutrientes e o efeito de reguladores de crescimento. Além disso, a concentração de sacarose afeta a produção de metabólitos secundários, de grande importância nos processos metabólicos e na composição da parede celular (Grattapaglia e Machado, 1998).

Haelterman e Docampo (1994) ajustaram um meio para a micropropagação das figueiras, cultivares Turco, Málaga e Kadota, isentas de

mosaico. Inicialmente, estacas com sintomas de mosaico foram enraizadas e submetidas à termoterapia (37°C durante 20 dias), das quais foram extraídas gemas, que foram inoculadas em meio MS acrescido de mio-inositol, tiamina, ácido ascórbico, glicina, piridoxina HCl, floriglucinol e sacarose, além dos fitorreguladores 6-benzilaminopurina, cinetina e giberelina, com ágar a 7 g.L⁻¹ e pH ajustado em 5,8. A taxa média de multiplicação foi de quatro a seis brotações/explante.

Em *Tournefortia cf. paniculata* (Bertolucci, 1999), quando foram comparadas o meio WPM e o meio básico MS em relação ao tamanho de brotações, notou-se um incremento de 30% neste parâmetro.

Kumar, Radha e Chitta (1998) estudando o efeito de diferentes meios de cultura em *Ficus carica*, observaram que o meio MS mostrou ser mais eficiente na multiplicação e indução de raízes, quando comparado com o meio B5.

O quadro a seguir ilustra a composição nutritiva de cada meio de cultura.

Alguns meios recomendados e usados em cultura de tecidos vegetais:				
Componentes	B5	MS	WPM	Knudson
Macronutrientes				
CaCl ₂	-	-	-	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	150	440	96	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	556	1000
KCl	-	-	-	250
KH ₂ PO ₄	-	170	170	-
KNO ₃	2.500	1900	-	-
K ₂ SO ₄	-	-	990	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	250	370	370	250
NaSO ₄ .H ₂ O	150	-	-	-
Na ₂ SO ₄	-	-	-	-
NH ₄ NO ₃	-	1650	400	-
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	-	-
Micronutrientes				
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	-	-	500
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	-	-
CuSO ₄				0,040
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,25	-
Fe(SO ₄) ₃	-	-	-	-
H ₃ BO ₃	3	6,2	6,2	0,056
KI	0,75	0,83	-	-
MnSO ₄ .H ₂ O	10	-	-	-
MnSO ₄ .4H ₂ O	-	22,3	22,3	7,5
MoO ₃	-	-	-	-
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,016
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2	8,6	8,6	0,331
FeEDTA:				-
Fe(SO ₄).7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	25
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,2	37,2	37,2	-
Orgânicos				
Ácido Fólico	-	-	-	-
Ácido Indol	-	-	-	-
Acético				
Ácido nicotínico	1,0	0,5	0,5	-
Biotina	-	-	-	-
Glicina	-	2,0	-	-
Mio-inositol	100	100	100	-
Piridoxina.HCl	1,0	0,5	0,5	-
Tiamina.HCl	10,0	0,5	1,0	-
Sacarose (g.L ⁻¹)	20	30	20	20

2.4 Reguladores de Crescimento

Os fitohormônios são compostos orgânicos sintetizados em uma parte da planta e translocados para outra, na qual, em pequenas concentrações, causam resposta fisiológica, que pode ser de promoção ou inibição dos processos de crescimento e diferenciação (Tombolato e Costa, 1998).

Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que, quando aplicadas nas plantas, apresentam propriedades químicas semelhantes à dos hormônios.

O efeito de cada tipo de regulador de crescimento no processo de crescimento e desenvolvimento da planta depende da espécie utilizada; da parte da planta; do estágio de desenvolvimento da planta e do tecido; da concentração utilizada e da interação entre os reguladores de crescimento. *In vitro*, o balanço hormonal no meio de cultura é determinante para o sucesso no processo de regeneração de plantas (Tombolato e Costa, 1998).

As auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores de crescimento (Skoog e Miller, 1957).

As auxinas são sintetizadas nas plantas, em regiões de crescimento ativo, como meristema apical, gemas axilares, folhas jovens, sendo, posteriormente, translocadas para diferentes órgãos, nos quais atuam no mecanismo interno que controla o crescimento. Assim, promovem o crescimento do caule, folhas e raízes e também são responsáveis pela dominância apical, podendo ainda ser usadas como herbicidas (2,4-D-ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (Tombolato e Costa, 1998).

As auxinas participam na formação e desenvolvimento de raízes adventícias nos caules de segmento vegetativos de plantas. Assim, é utilizada na prática de reprodução assexuada de muitas espécies.

A auxina mais usada pra estimular multiplicação em meio de cultura é o ANA (ácido alfa-naftaleno acético), seguido de AIB (ácido indol-3-butírico) e AIA (ácido 3-indolilacético). As concentrações utilizadas de ANA e AIB são abaixo de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto AIA, por ser menos estável em cultura, pode ser adicionado em concentrações superiores. Concentrações altas de auxina podem estimular o enraizamento e formação de calos em detrimento da multiplicação (Tombolato e Costa, 1998).

Lane (1978) verificou que para a cultivar McIntosh de macieira não é necessária a aplicação de auxina exógena para a proliferação de brotos.

A adição do ácido naftalenoacético (ANA) ao meio de cultura pode provocar inibição da proliferação de brotações, quando usado em doses entre $0,1$ e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$, segundo Abbott e Whiteley (1976) e Lane (1978).

Kumar, Radha e Chitta (1998), em trabalho com figo *Ficus carica* L., verificaram que a concentração de 2 mg.L^{-1} de AIB foi suficiente para promover o desenvolvimento de raízes e parte aérea.

As citocininas são substâncias reguladoras de crescimento que causam divisão celular nas plantas, alongamento e diferenciação celular, retardam a senescência das plantas, promovem a quebra da dominância apical e induzem proliferação de gemas axilares. É fundamental para multiplicação da parte aérea e indução de gemas adventícias e sua concentração e tipo são os fatores que mais influenciam a multiplicação *in vitro*. A citocinina mais utilizada é o BAP, seguido da cinetina. Essas citocininas têm sido empregadas na maioria dos experimentos, mas pode ser que para uma determinada espécie de plantas, outras citocininas sejam mais eficientes. Para multiplicação em meio de cultura, em

geral, as concentrações utilizadas variam de 0,1 a 5 mg.L⁻¹ (Tombolato e Costa, 1998).

O estímulo ao crescimento e desenvolvimento, através da divisão e alongamento celular, é aumentado quando se utiliza uma combinação entre auxina e citocinina, que atua no controle da morfogênese e formação de órgãos em cultura de tecidos.

Em meio para micropropagação, as concentrações efetivas de cada regulador de crescimento irão variar e serão ajustadas de acordo com o genótipo da planta a ser cultivada, o tipo de tecido, o método de micropropagação e o estágio da cultura. A maioria dos pesquisadores prefere usar apenas um ou no máximo dois componentes. Entretanto, a mistura de mais de uma auxina pode ser particularmente efetiva para a indução do enraizamento. As citocininas abrangem uma classe de reguladores de crescimento que estimulam a síntese protéica. Por esta razão, elas podem promover a maturação dos cloroplastos e atrasar a senescência de folhas destacadas. A aplicação de citocinina em um órgão da planta (por exemplo, uma folha) faz com que o órgão tratado se torne um centro de convergência de aminoácidos, que então migram para a região próxima. O efeito das citocininas é mais notável em culturas de tecidos em que elas são usadas, freqüentemente junto com as auxinas, para estimular a divisão celular e controlar a morfogênese. Adicionadas à cultura de brotações, estas substâncias reduzem a dominância apical e liberam gemas laterais da dormência. Neste caso, elas parecem ter um efeito oposto ao da auxina endógena (Torres e Caldas, 1990).

É fundamental o balanço hormonal entre a citocinina e a auxina no controle da morfogênese e formação de órgãos em cultura de tecidos (Tombolato e Costa, 1998).

Yui et al. (1993) observaram que o BAP, nas concentrações de 0,5 a 2 mg.L⁻¹, foi eficiente na proliferação de brotações do porta-enxerto de macieira

cv. M.7, e na concentração de 2 mg.L⁻¹, favoreceu a multiplicação da cv. Marubakaido (Schuch e Peters, 1993). Leite, Finardi e Fortes (1997) obtiveram brotações em microestacas de pereira cv. Bartlett, na concentração de 2,4 mg.L⁻¹ de BAP. Já Dal Vesco e Guerra (1999) obtiveram brotações de microestacas em goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg) com BAP a 2 µM, em mistura com GA₃ 0,03µM.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi constituído de três experimentos, relativos à multiplicação e ao enraizamento das brotações *in vitro*, realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos vinculado ao Departamento de Agricultura da UFLA, em Lavras, MG. Para o preparo dos meios, foram utilizadas soluções estoque preparadas com água destilada e armazenadas em frascos de vidro escuro, a uma temperatura próxima de 5°C.

O ajuste do pH do meio foi feito com NaOH 0,5 e 0,1 N, e quando necessário, com HCL 0,1 N, antes da adição do ágar. Após o preparo, os meios foram autoclavados a 1,5 atm e à temperatura de 120°C, durante 20 minutos.

O manuseio do material vegetal ocorreu em câmara de fluxo laminar, desinfetada com álcool (etanol) a 70%. Os explantes, constituídos de brotações com 1-2 cm e 2 gemas, foram excisados de plântulas mantidas *in vitro*, provenientes da cultura de meristemas, e inoculados individualmente em tubos de ensaio com dimensões de 150 x 25mm, cobertos com tampas plásticas translúcidas e seladas com filme de PVC. Posteriormente, os tubos contendo as plântulas foram colocados em sala de crescimento, com luminosidade em torno de 35µM.m⁻².s⁻¹, 27±2°C e fotoperíodo de 16 horas.

3.1 Experimento 1 - Efeito de diferentes meios nutritivos associados a várias concentrações de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.

Neste experimento, utilizaram-se cinco diferentes meios nutritivos: MS (Murashide e Skoog, 1962), Knudson (modificado por Ardite, 1967), WPM (Lloyd e McCown, 1980), White (1943) e B5 (desenvolvido por Gamborg, Miller e Ojima, 1968), cada um associado a quatro concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 g.L⁻¹).

3.2 Experimento 2 - Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na multiplicação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.).

No segundo experimento, foram utilizadas cinco concentrações de BAP (0; 0,5; 1; 2; 4 mg.L⁻¹), associando-as a quatro concentrações de ANA (0; 0,05; 0,1; 0,2 mg.L⁻¹), em meio WPM acrescido de 15 g.L⁻¹ de sacarose.

3.3 Experimento 3 - Efeito de diferentes doses de AIB associadas a diferentes concentrações do meio de cultura WPM no enraizamento *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.).

Neste experimento, foram utilizadas concentrações dos sais do meio WPM (0, 25, 50, 100, 200%), acrescidos de 15 g.L⁻¹ de sacarose, com concentrações de AIB (0; 1; 2; 4 mg.L⁻¹).

O delineamento experimental utilizado, para todos os experimentos, foi o inteiramente ao acaso em esquema fatorial 5 x 4, com quatro repetições, três tubos por parcela, cada tubo contendo um explante. Utilizou-se o programa de análise estatística Sisvar (Ferreira, 2000) para a obtenção da análise de variância. Os fatores foram analisados através de regressão polinomial.

Após 8 semanas, os experimentos foram avaliados, observando-se as seguintes variáveis:

- Comprimento da maior raiz: Obtido através da medição da maior raiz adventícia primária emitida, em centímetros;
- Comprimento da Parte Aérea: Obtido através da medição da altura da haste única, desde o colo da plântula até o meristema apical, em centímetros;
- Número total de Brotos: Contagem total de brotos/plântula;
- Número de brotos iguais ou maiores que 1 cm: Contagem do número de brotos/plântula iguais ou superiores a 1 cm.
- Peso da matéria fresca de raízes: Foi obtida através da pesagem do sistema radicular, em gramas/plântula.
- Peso da matéria fresca da parte aérea: Foi obtida através da pesagem da parte aérea, em gramas/plântula.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1 - Efeito de diferentes meios nutritivos associados a várias concentrações de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.

Avaliando o efeito da sacarose em diferentes meios de cultura, (Tabela 1), observa-se que houve efeito significativo para a interação sacarose x meios de cultura nas características comprimento da parte aérea, número total de brotos, brotos maiores que 1 centímetro e peso da matéria fresca da parte aérea. Não houve efeito significativo para as características comprimento da maior raiz e peso da matéria fresca de raízes.

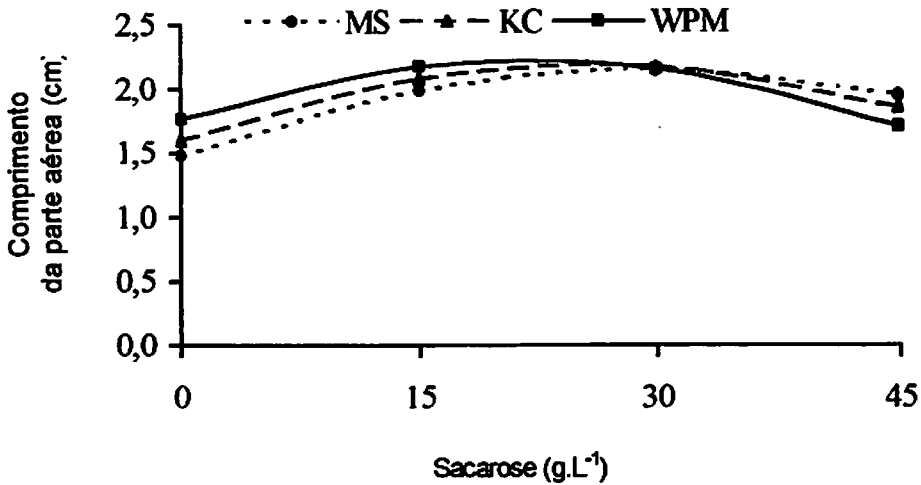
Tabela 1. Análise de variância para as características comprimento da parte aérea (CPA), número total de brotos (NB), número de brotos > 1centímetro (NB>1cm) e peso da matéria fresca da parte aérea (PFPA). UFPA, Lavras-MG, 2001.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios			
		CPA	NB	NB>1cm	PFPA
Meio	4	0,6443**	120,07**	4,344**	0,1982**
Sacarose	3	0,2922**	76,64**	1,957**	0,0811**
Meio x sacarose	12	0,2822**	42,71**	2,468**	0,0414**
Erro	60	0,0652	2,42	0,168	0,0062
CV (%)		14,35	7,23	87,67	55,40

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Comprimento da Parte Aérea

Maiores comprimentos da parte aérea foram obtidos com os meios MS, KC e WPM, acrescidos de 32, 28 e 22g.L⁻¹ de sacarose, respectivamente (Figura 1).



$$Y_{MS} = 1,485 + 0,045x - 0,0007x^2 \quad R^2 = 0,99$$
$$Y_{KC} = 1,602 + 0,045x - 0,0008x^2 \quad R^2 = 0,70$$
$$Y_{WPM} = 1,767 + 0,041x - 0,0009x^2 \quad R^2 = 0,47$$

FIGURA 1. Comprimento da parte aérea de *Ficus carica in vitro* desenvolvido em meios MS, WPM e Knudson, suplementados com diferentes concentrações de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Houve uma resposta significativa no comprimento da parte aérea dos explantes inoculados em meio sem sacarose. Esse resultado pode ser devido ao tempo de permanência dos explantes no meio (60 dias), sugerindo que melhores respostas podem ser obtidas aumentando-se o tempo de permanência. A pouca diferença entre o comprimento das partes aéreas dos explantes inoculados em

meio sem sacarose, quando comparado com os inoculados com sacarose, provavelmente ocorreu devido ao prazo em que os explantes permaneceram no meio de cultura, o crescimento da parte aérea se deu às expensas da energia dos próprios explantes e não de uma fonte de carbono exógena. Caldas, Haridasan e Ferreira (1998) afirmaram que os carboidratos podem estimular determinados processos e inibir outros, e muitas vezes as concentrações utilizadas para promover o crescimento dos explantes podem ser inibitórias para a síntese de clorofila.

O aumento das concentrações de sacarose proporcionou um incremento no comprimento da parte aérea dos explantes até um ponto em que se verificou decréscimo desta variável, provavelmente devido ao aumento excessivo do potencial osmótico do meio de cultura, dificultando o desenvolvimento dos explantes.

Tendência similar foi observada em estudos com a macieira 'Marubakaido', realizados por Hoffmann (1999), em que elevadas concentrações de sacarose desfavoreceram o crescimento *in vitro*, afetando o desenvolvimento e o crescimento das mudas. Alves (2000), em trabalho com cultivo *in vitro* de embriões imaturos de *Citrus reticulata* 'Ponkan', constatou que o maior comprimento da parte aérea foi obtido com 30 e 15 g.L⁻¹ de sacarose.

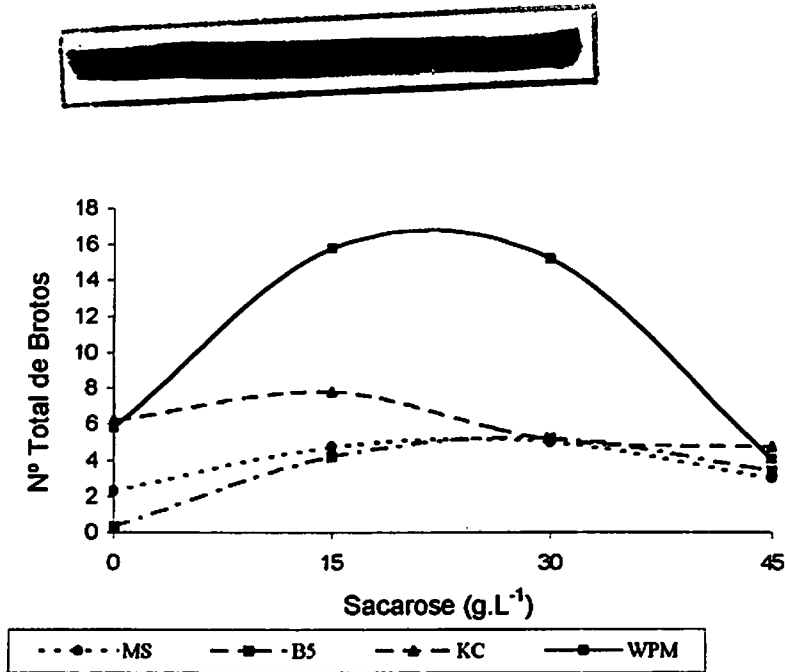
As melhores concentrações de sacarose encontradas no presente trabalho, de uma maneira geral, estão próximas da concentração recomendada (30g.L⁻¹) para a maioria das culturas; entretanto, no período de 60 dias, o maior comprimento da parte aérea foi observado na ausência de sacarose.

Número Total de Brotos

O meio de cultura WPM proporcionou o maior número total de brotos (17/explante) na concentração de 22g.L^{-1} de sacarose, enquanto, para o meio KC, a melhor concentração foi a de 15g.L^{-1} , com 7 brotos/explantes. O maior número total de brotos nos meios MS e B₃ foi obtido nas concentrações de 24 e 28g.L^{-1} de sacarose, respectivamente, obtendo uma média de cinco brotos em ambos (Figura 2).

O resultado obtido com o meio WPM atesta o fato de esse meio ser indicado para multiplicação de brotações lenhosas (Pasqual, Hoffmann e Ramos, 1997). Os meios KC, MS e B₃ apresentaram resultados semelhantes entre si.

O aumento das concentrações de sacarose proporcionou maior número total de brotos até determinado nível, a partir do qual se observou decréscimo nessa variável. As concentrações de 2-4% (p/v) são as mais comuns, sendo que acima desta faixa há um aumento excessivo do potencial osmótico, dificultando a multiplicação (Grattapaglia e Machado, 1998).



$$\begin{aligned}
 Y_{WPM} &= 5,797 + 1,015x - 0,023x^2 & R^2 &= 0,77 \\
 Y_{MS} &= 2,30 + 0,2367x - 0,0049x^2 & R^2 &= 0,93 \\
 Y_{B5} &= 0,323 + 0,352x - 0,0063x^2 & R^2 &= 0,48 \\
 Y_{KC} &= 6,1625 + 0,395x - 0,0239x^2 + 0,0003x^3 & R^2 &= 1
 \end{aligned}$$

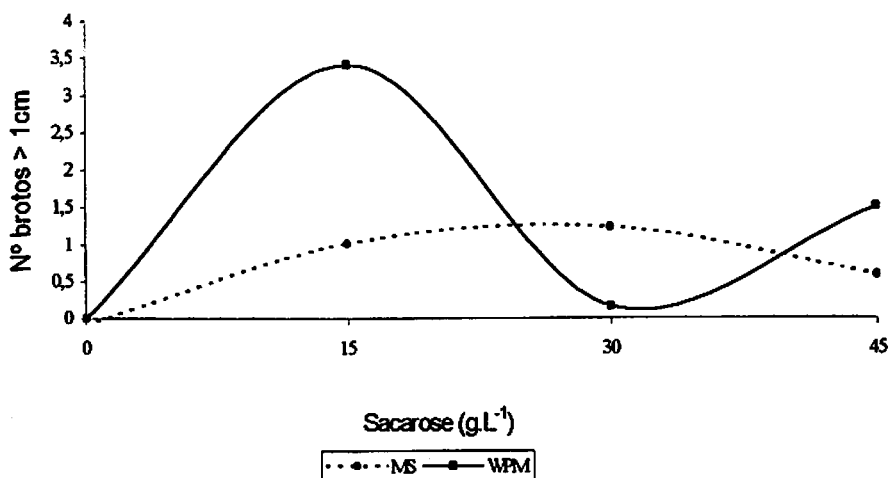
FIGURA 2. Número total de brotos de *Ficus carica in vitro* desenvolvido em meios MS, B5, Knudson e WPM, suplementados com diferentes concentrações de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Número de Brotos maiores que 1 cm

Melhores resultados foram obtidos quando explantes foram inoculados nos meios WPM e MS nas concentrações de 15 e 30 g.L⁻¹ de sacarose, obtendo 3 e 1 brotos/explante, respectivamente (Figura 3).

O meio WPM proporcionou maior número de brotos maiores que 1 cm. A mesma resposta foi encontrada em estudos com *Pterodon pubescens* Benth., em que os segmentos nodais foram melhor estabelecidos em meio WPM, quando comparado com o meio MS e outros. Em *Tournefortia cf. paniculata* (Bertolucci, 1999), quando foram comparados o meio WPM e o meio básico MS

em relação ao tamanho de brotações, notou-se um incremento de 30% neste parâmetro.



$$Y_{MS} = -0,087 + 0,1023x - 0,001x^2 \quad R^2 = 0,87$$

$$Y_{WPM} = -0,000 + 0,6998x - 0,0398x^2 + 0,0005x^3 \quad R^2 = 1$$

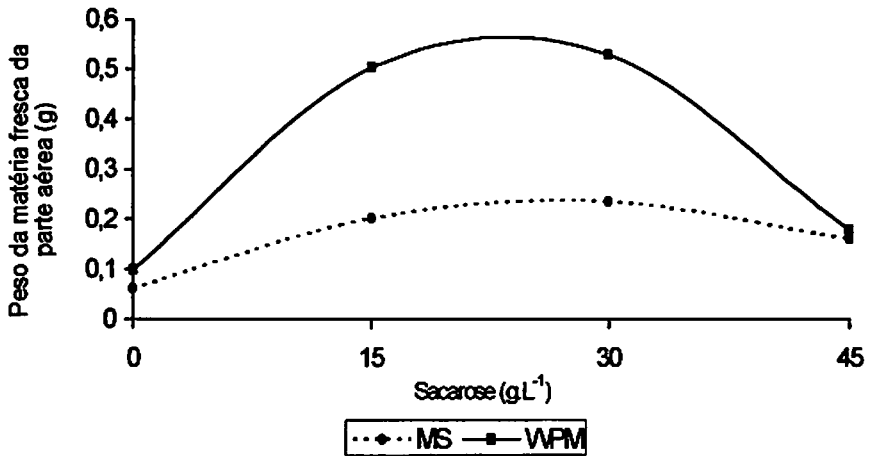
FIGURA 3. Número de brotos maiores que 1cm em plântulas de *Ficus carica in vitro* desenvolvidos em meios MS e WPM, suplementados com diferentes concentrações de sacarose. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Peso da Matéria Fresca da Parte Aérea

Os meios WPM e MS acrescidos de 25 e 32 g.L⁻¹ de sacarose, respectivamente, foram os que proporcionaram maior peso da matéria fresca da parte aérea (Figura 4). O melhor resultado obtido com o WPM corrobora a indicação de se utilizar este meio na micropropagação de espécies lenhosas.

O aumento das concentrações de sacarose proporcionou um incremento no peso da matéria fresca da parte aérea até determinado nível, com subsequente decréscimo. Esta redução possivelmente ocorreu em função da elevação do potencial osmótico e inibição da síntese de clorofila.

Concentrações de 2-4% (p/v) são as mais comuns. Abaixo dessa faixa, pode ocorrer clorose nas culturas, acima dela, pode-se incorrer em problemas de excessivo potencial osmótico do meio, possibilitando deterioração das culturas. (Grattapaglia e Machado, 1998).



$$Y_{MS} = 0,0621 + 0,0129x - 0,0002x^2 \quad R^2 = 0,92$$

$$Y_{WPM} = 0,0985 + 0,0395x - 0,0008x^2 \quad R^2 = 0,89$$

FIGURA. 4. Peso da matéria fresca da parte aérea de *Ficus carica in vitro* desenvolvidas em meios MS e WPM, suplementados com diferentes concentrações de sacarose. UFPA, Lavras-MG, 2001.

4.2 Experimento 2 - Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na multiplicação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.).

Analisando a Tabela 2, observa-se que houve efeito significativo para a interação BAP x ANA em todas as características avaliadas, exceto para peso da matéria fresca da raiz e peso da matéria fresca da parte aérea

Tabela 2. Análise de variância para as características comprimento da maior raiz (CR) comprimento da parte aérea (CPA), número total de brotos (NB), número de brotos maiores que 1cm (NB>1cm), peso da matéria fresca da raiz (PFR) e peso da matéria fresca da parte aérea (PFPA). UFLA, Lavras-MG, 2001.

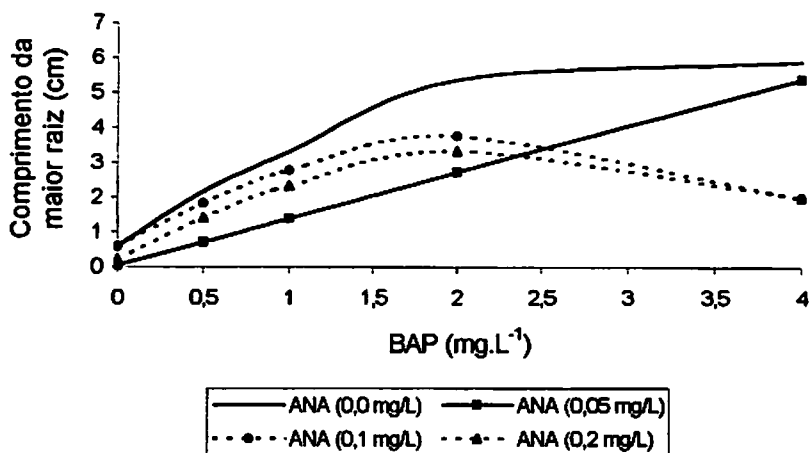
Fonte de variação	de GL	Quadrados Médios					
		CR	CPA	NB	NB>1	PFR ¹	PFPA ¹
BAP	5	43,6**	18,23**	58,6**	43,2**	0,29 ^{ns}	0,93 ^{ns}
ANA	4	6,17 ^{ns}	13,66**	13,2**	21,6**	0,22 ^{ns}	0,80 ^{ns}
BAPxANA	11	5,76**	9,15**	15,8**	13,7**	0,22 ^{ns}	0,78 ^{ns}
ERRO	59	1,92	0,28	2,29	0,79	0,22	0,81
CV(%)		57,74	17,88	27,51	36,0	44,3	78,33

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

¹ Variável transformada pela equação $(X+1)^{0.5}$

Comprimento da maior raiz

Os melhores resultados para esta variável foram observados com a utilização de 2 a 4 mg.L⁻¹ de BAP, na ausência de ANA (Figura 5). Quando se utilizou 0,05 mg.L⁻¹ de ANA, pôde-se observar uma resposta linear crescente no comprimento da maior raiz. Nas concentrações mais elevadas de ANA, o comprimento da maior raiz aumentou até 2 mg.L⁻¹ de BAP, decrescendo posteriormente.



$$\begin{aligned}
 Y_0 &= 0,5753 + 3,4641x - 0,5315x^2 & R^2 &= 0,94 \\
 Y_{0,05} &= 0,0369 + 1,3447x & R^2 &= 0,94 \\
 Y_{0,1} &= 0,5673 + 2,8257x - 0,6171x^2 & R^2 &= 0,79 \\
 Y_{0,2} &= 0,1971 + 2,6939x - 0,5609x^2 & R^2 &= 0,97
 \end{aligned}$$

FIGURA 5. Comprimento de raízes de plântulas *Ficus carica in vitro* desenvolvidas em meio WPM, suplementado com diferentes concentrações de BAP e ANA. UFLA, Lavras-MG, 2001.

O maior comprimento da raiz observado na ausência de ANA demonstra o efeito deletério desse regulador nesta variável. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) a rizogênese ocorre no período de 1 a 3 semanas e pode ser dividida em indução, iniciação e alongação de raízes, enquanto as duas primeiras fases respondem ou dependem de auxina; o crescimento das raízes é inibido pela presença desta.

A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação entre auxinas e citocininas, sendo que, no processo de rizogênese, aparentemente há uma relação quantitativa entre níveis de auxina e citocinina, que é responsável pelo início do processo (Skoog e Miller 1957).

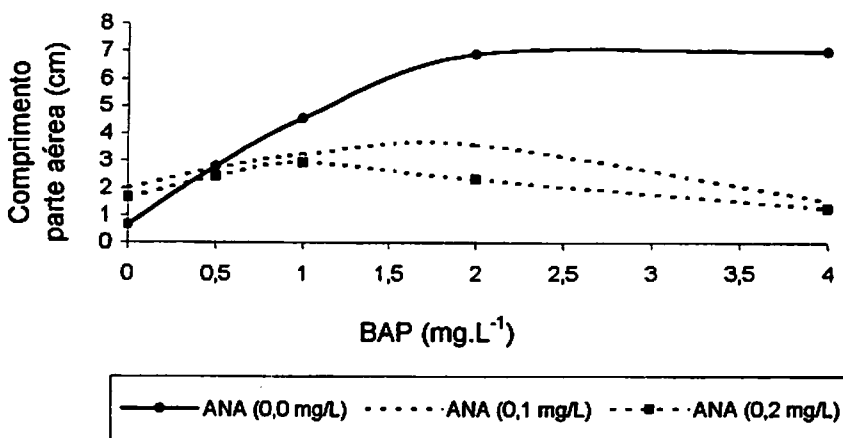
Embora o BAP seja relatado como inibidor do processo de enraizamento (Grattapaglia, Assis e Caldas, 1987), no presente trabalho constatou-se o seu efeito benéfico na elongação do sistema radicular formado. Desta forma, onde se verificou uma relação auxina/citocinina baixa (0 mg.L^{-1} de ANA/ $2-4 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA/ 4 mg.L^{-1} de BAP), obtiveram-se maiores comprimentos de raízes, enquanto, numa relação auxina/citocinina mais alta, com $0,1$ ou $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA, menor crescimento de raiz foi observado.

Comprimento da Parte Aérea

Maior comprimento da parte aérea foi observado com 2 e 4 mg.L^{-1} de BAP na ausência de ANA, apresentando média de 7 cm de comprimento (Figura 6). Quando se utilizou ANA, menor comprimento da parte aérea foi observado, e à medida que se elevou a concentração de ANA de $0,1$ para $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$, a queda foi mais acentuada. A concentração de 2 mg.L^{-1} de BAP na ausência de ANA incrementou não só o comprimento da raiz, como também o da parte aérea.

Para Pierik (1990), um adequado balanço entre auxinas e citocininas estabelece um eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro*. Segundo Cheema e Sharma (1983), o BAP induz a uma alta taxa de multiplicação.

Schuch (1989), trabalhando com macieira 'Marubakaido', verificou que a melhor taxa de multiplicação foi obtida com 2 mg.L^{-1} de BAP. Para James (1981), BAP nas concentrações de $1-2 \text{ mg.L}^{-1}$, para a multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira cv.M9, mostrou também ser eficiente. Sugere-se que concentrações excessivas de citocininas podem causar efeito tóxico, o que compromete a eficiência do sistema.



$$Y_0 = 0,6401 + 4,6813x - 0,7709x^2 \quad R^2 = 0,93$$

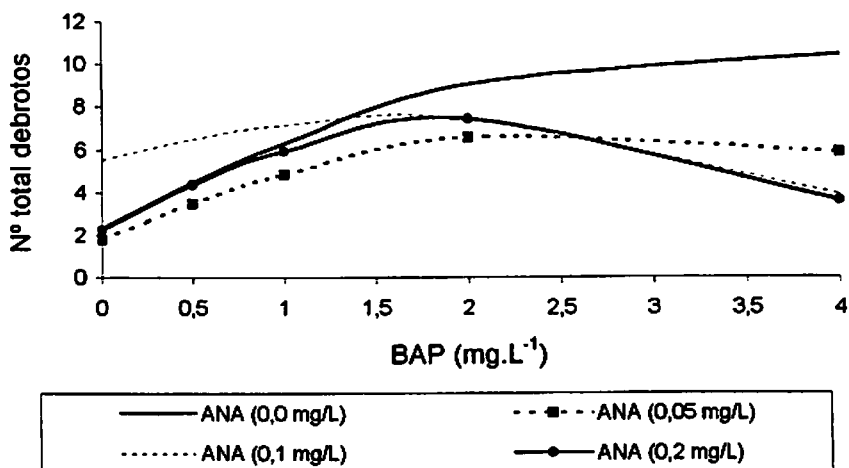
$$Y_{0,1} = 1,9789 + 1,7202x - 0,4573x^2 \quad R^2 = 0,85$$

$$Y_{0,2} = 1,6357 + 1,7717x - 0,4662x^2 \quad R^2 = 0,89$$

FIGURA 6. Comprimento da parte aérea de plântulas de *Ficus carica in vitro* cultivadas em meio WPM suplementado com a diferentes concentrações de BAP e ANA. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Número Total de Brotos

Observou-se que concentrações de 2-4 mg.L⁻¹ de BAP, na ausência de ANA, apresentaram maior número total de brotos (Figura 7). Quando se utilizou ANA notou-se resultados semelhantes nas concentrações de BAP, exceto com 0,1 mg.L⁻¹ de ANA; na ausência de BAP houve emissão considerável de brotos, indicando que no meio com baixa concentração de auxina pode-se obter bom número de brotos. É importante notar que até as concentrações de 0,1; 0,05 e 0,2 mg.L⁻¹ de ANA associadas a 2 mg.L⁻¹ de BAP, promoveram um acréscimo no número total de brotos, iniciando-se a partir daí uma redução na emissão de brotos.



$Y_0 = 2,2776 + 4,6767x - 0,662759x^2$	$R^2 = 0,95$
$Y_{0,05} = 1,7666 + 3,7571x - 0,683012x^2$	$R^2 = 0,78$
$Y_{0,1} = 5,5370 + 2,2672x - 0,667803x^2$	$R^2 = 0,89$
$Y_{0,2} = 2,2262 + 4,8318x - 1,121409x^2$	$R^2 = 0,90$

FIGURA 7. Número total de brotos de plântulas de *Ficus carica* *in vitro* cultivadas em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de BAP e ANA. UFLA, Lavras-MG, 2001.

Em trabalho com macieira, Yui (1990) observou melhores resultados com a aplicação de 5 mg.L⁻¹ de BAP, independente de ANA, comprovando que este regulador de crescimento (BAP) deve ser incorporado ao meio de cultura para permitir uma taxa de multiplicação de brotos.

Estudos com videira, realizados por Peixoto (1990), evidenciaram que o aumento da concentração de ANA reduz o número de brotações produzidas. Maior número de brotações por explante foi obtido com BAP a 1 mg.L⁻¹, na ausência de ANA. Novak e Juvova (1983) verificaram efeitos prejudiciais da adição do ANA em meio de cultura para regeneração de segmentos nodais de videira. Provavelmente a adição de ANA provocou o desbalanceamento da

relação endógena de auxinas e citocininas dos explantes, reduzindo o número de brotações produzidas. O efeito benéfico do BAP na multiplicação das brotações pode ser relacionado com a influência deste regulador de crescimento, na divisão celular e na liberação das gemas axilares inibidas pela dominância apical.

Número de Brotos Maiores que 1 cm

A produção de brotos maiores que 1 cm foi melhor com a utilização BAP nas concentrações de 2 a 4 mg.L⁻¹, na ausência de ANA (Figura 8). Houve um acréscimo no número de brotos maiores que 1 cm até as concentrações de 1,8 e 2,1 mg.L⁻¹ de BAP, associadas a 0,1 e 0,2 mg.L⁻¹ de ANA, a partir das quais nota-se um decréscimo do número de brotos. Quando se utilizou 0,05 mg.L⁻¹ de ANA, a queda na produção de emissão de brotos só foi verificada com 3 mg.L⁻¹ de BAP, evidenciando que, dependendo da relação auxina/citocinina, verificam-se diferentes respostas dos explantes. Abbott e Whiteley (1976) constataram que a aplicação de ANA ao meio de cultivo pode provocar inibição da multiplicação de brotações, quando em concentrações entre 0,1-0,2 mg.L⁻¹.

Yui et al. (1993) observaram que o BAP, nas concentrações de 0,5 a 2 mg.L⁻¹, foi eficiente na proliferação de brotações do porta-enxerto de macieira da M.7; na concentração de 2 mg.L⁻¹, favoreceu a multiplicação da cv. 'Maçubakaido' (Schuch e Peters, 1993).

Embora as auxinas não sejam sempre necessárias ao meio de multiplicação (Quoirin e Lepoivre, 1977), são utilizadas com o intuito de estimular o crescimento das partes aéreas (Grattapaglia e Machado, 1998).

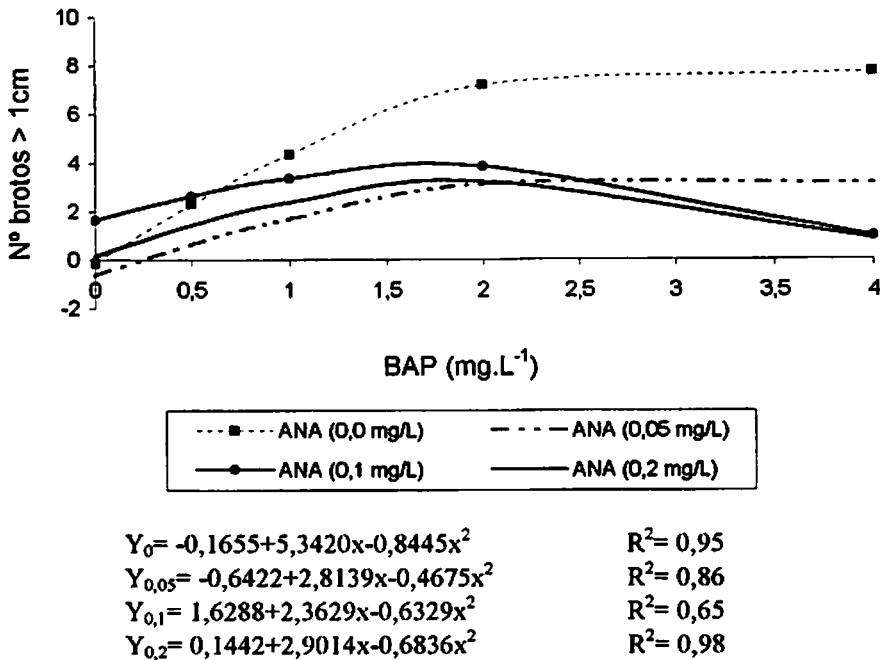


FIGURA 8. Número de brotos maiores que 1 cm plântulas de *Ficus carica in vitro* cultivadas em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de BAP e ANA. UFLA, Lavras-MG, 2001.

4.3 Experimento 3 - Efeito de diferentes concentrações de AIB associadas a diferentes concentrações dos sais do meio de cultura WPM no enraizamento *in vitro* de *Ficus carica L.*

Houve efeito significativo da interação WPM x AIB para as características comprimento da maior raiz e comprimento da parte aérea. Para peso da matéria fresca da raiz, peso da matéria parte aérea e número de brotos, apenas o fator WPM foi significativo. O uso do regulador de crescimento AIB, isoladamente, não foi significativo para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância para as características comprimento da raiz (CR), comprimento da parte aérea (CPA), número total de brotos (NB), número de brotos maiores que 1cm (NB>1cm), peso da matéria fresca da raiz (PFR) e peso da matéria fresca da parte aérea (PFPA). UFLA, Lavras-MG, 2001.

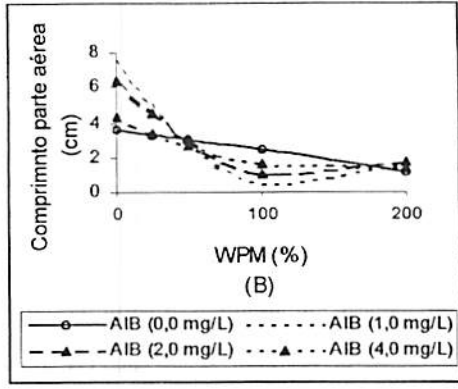
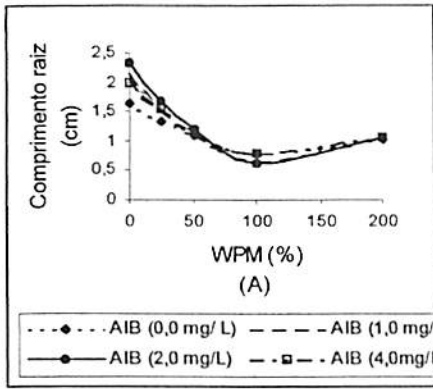
Fonte de variação	GL	Quadrados Médios					
		CR	CPA	NB	NB>1 ¹	PFR ¹	PFPA ¹
WPM	4	5,81**	60,6**	215,2**	68,6 ^{ns}	0,046**	0,17**
AIB	3	0,051 ^{ns}	2,66 ^{ns}	2,72 ^{ns}	62,3 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}
WPMx AIB	12	0,16**	5,5**	32,76 ^{ns}	59,4 ^{ns}	0,008 ^{ns}	0,01 ^{ns}
ERRO	60	0,087	1,74	20,58	54,3	0,011	0,02
CV(%)		22,41	41,45	32,31	316,5	10,44	41,62

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

¹ Variável transformada pela equação $(X+1)^{0,5}$

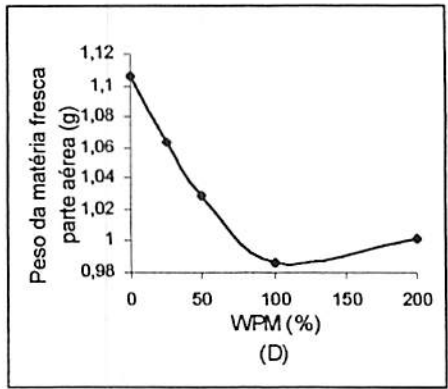
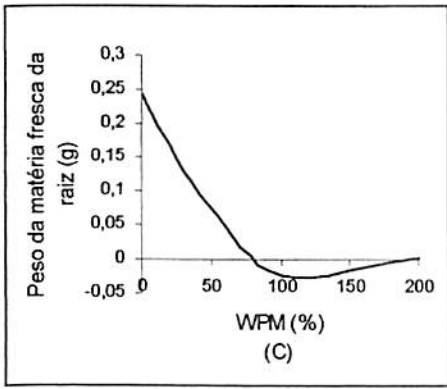
Comprimento e Peso da Matéria Fresca da Raiz e Parte Aérea

Melhor comprimento da maior raiz foi obtido na ausência de sais do meio WPM, na concentração de 2 mg.L⁻¹ de AIB (Figura 9A), proporcionando um percentual de enraizamento de 23%. À medida que se elevou a concentração de sais do meio, constatou-se uma diminuição no comprimento da maior raiz, independentemente da concentração de AIB. No meio sem a presença de sais do meio WPM, o menor comprimento de raízes foi verificado na ausência de AIB (1,63 cm). Entretanto, a diferença entre este valor e o obtido com 2 mg.L⁻¹ de AIB é pequena, indicando que para o enraizamento da figueira *in vitro* não é necessária a utilização de regulador de crescimento AIB.



$$Y_0 = 1,63992 - 0,0138x + 0,000034x^2 \quad R^2 = 0,65$$
$$Y_1 = 2,075 - 0,0233x + 0,000091x^2 \quad R^2 = 0,65$$
$$Y_2 = 2,3189 - 0,0272x + 0,000107x^2 \quad R^2 = 0,73$$
$$Y_4 = 1,9983 - 0,021x + 0,00081x^2 \quad R^2 = 0,73$$


$$Y_0 = 3,6080 - 0,012x \quad R^2 = 0,83$$
$$Y_1 = 7,390 - 0,110x + 0,000407x^2 \quad R^2 = 0,80$$
$$Y_2 = 6,3434 - 0,08204x + 0,000295x^2 \quad R^2 = 0,71$$
$$Y_4 = 4,319 - 0,0406x + 0,000131x^2 \quad R^2 = 0,76$$



$$Y_{WPM} = 0,2435 - 0,0041x + 0,000015x^2 \quad R^2 = 0,81$$

$$Y_{WPM} = 1,1061 - 0,0019x + 0,000007x^2 \quad R^2 = 0,87$$

FIGURA 9. Plântulas de *Ficus carica in vitro* cultivadas em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de AIB: A) comprimento da maior raiz; B) comprimento da parte aérea. Plântulas de *Ficus carica in vitro* cultivadas em meio WPM: C) peso da matéria fresca da raiz; D) peso fresco da parte aérea.



Kumar, Radha e Chitta (1998) verificaram que a concentração de 2 mg.L⁻¹ de AIB era suficiente para promover o desenvolvimento de raízes e parte aérea.

Maior comprimento da parte aérea foi obtido na ausência de sais do meio WPM e concentração de 1 e 2 mg.L⁻¹ de AIB (Figura 9B). Quando a concentração de sais foi aumentada, houve um decréscimo no comprimento da parte aérea, independentemente da concentração de AIB utilizada.

As concentrações de 1 e 2 mg.L⁻¹ de AIB proporcionaram tanto maior comprimento da parte aérea quanto maior raiz, evidenciando que maior desenvolvimento do sistema radicular proporciona maior desenvolvimento da parte aérea.

Analisando as Figuras 9C e 9D, pode-se verificar que o maior peso da matéria fresca da raiz e parte aérea foi obtido na ausência de sais do meio WPM, verificando efeito negativo destes ao meio.

Embora o meio WPM seja indicado e mais utilizado na micropropagação de plantas lenhosas, por ter baixas concentrações de sais (McCown e Sellmer, 1987), no presente trabalho constatou-se seu efeito deletério tanto no desenvolvimento do sistema radicular quanto da parte aérea.

Esse resultado contraditório possivelmente está relacionado com a fase de multiplicação, anterior ao enraizamento, na qual os explantes encontram-se em meio contendo citocinina.

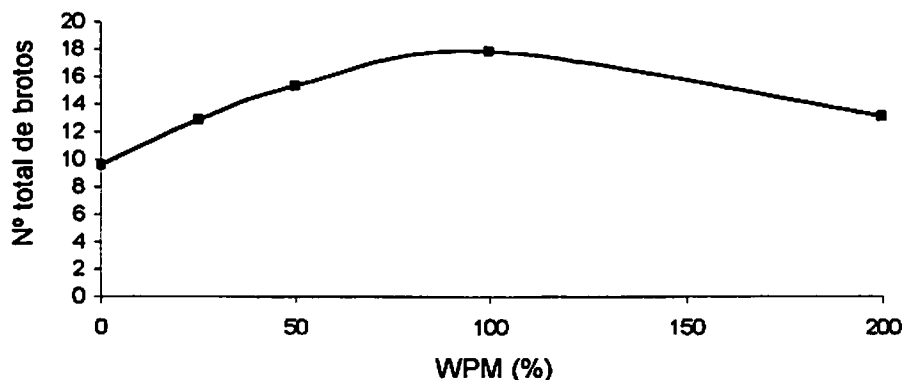
O efeito das citocininas não se restringe a uma subcultura, constatando-se diversas vezes um efeito residual de uma cultura para outra. Esse efeito pode ser problemático e tornar-se limitante na fase de enraizamento (Grattapaglia e Machado, 1998). Uma correlação negativa alta entre a concentração de BAP no meio de multiplicação e a taxa de enraizamento na geração seguinte de subcultura, na ausência de fitorreguladores, foi verificada em diversas espécies de *Eucalyptus* (Grattapaglia, Assis e Caldas, 1987).

Para resolver o problema do efeito residual, torna-se necessário uma fase intermediária de alongamento com o objetivo de desintoxicar as culturas, o que não foi realizado não presente trabalho.

Número Total de Brotos

Maior número total de brotos foi obtido com 100% da concentração de sais do meio WPM (Figura 10). É possível que o efeito residual do BAP, agindo negativamente no comprimento e matéria fresca da raiz e parte aérea, tenha promovido um efeito benéfico na emissão de brotos, visto que este é um dos efeitos mais marcantes na utilização de BAP.

Kumar, Radha e Chitta (1998) indicam a utilização de 2 mg.L⁻¹ de BAP associado a 0,2 mg.L⁻¹ de ANA para a indução de brotações em *Ficus carica*.



$$Y_{WPM} = 9,5831 + 0,1471X - 0,0006X^2 \quad R^2 = 0,77$$

FIGURA 10. Número total de brotos em plântulas de *Ficus carica* *in vitro*, cultivadas em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de AIB. UFLA, Lavras-MG, 2001.

5 CONCLUSÕES

Segmentos nodais de *Ficus carica* cultivar 'Roxo de Valinhos' podem ser propagados *in vitro* em meio básico WPM suplementado com 15 g.L⁻¹ de sacarose e multiplicadas com 2 mg.L⁻¹ de BAP na ausência de ANA.

Maior número total de brotos foi obtido com 100% da concentração de sais do meio WPM.

Melhores características de comprimento da raiz e parte aérea são obtidos em meio com 2 mg.L⁻¹ de AIB na ausência de sais do meio WPM, com um percentual de enraizamento de 23%.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, A.J.; WHITELEY, E. Culture of malus tissue in vitro. I. Multiplication of apple plants from isolated shoot apices. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.4, n.2, p.183-189, 1976.
- ALVES, G.P. Resgate de embriões imaturos obtidos por polinização natural e controlada de tangerina poncã. Lavras, MG: UFLA, 2000. 85p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia).
- BARBOSA, W.; CAMPO-DALL'ORTO, F.A.; OJIMA, M.; MARTINS, F.P.; BOVI, V.; CASTRO, J.L.de. Produção de mudas da figueira 'Roxo de Valinhos' através da cultura *in vitro*. *O agrônomo*, Campinas, SP, v.44, n.1/3, p.6-18, jan./dez. 1992.
- BERTOLUCCI, S.K.V. Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica *in vitro* de *Tournefortia cf paniculata* Cham. Lavras, MG: UFLA, 1999. 79p. (Dissertação – Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica).
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1998. p.37-70.
- CHEEMA, G.S.; SHARMA, D.P. *In vitro* propagation of apple rootstocks-EMLA. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v.131, p.75-88, 1983.
- CORRÊA, D. de M. Enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira (*Malus domestica* Borkh.). Lavras, MG: ESAL, 1990. 50p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- CORRÊA, D. de M.; PASQUAL, M.; YUI, E. Concentração de ácido giberélico e de ácido naftalenoacético na propagação *in vitro* da macieira 'Fuji'. *Ciência e Prática*, Lavras, MG, v.15, n.1, p.26-31, jan./mar. 1991.
- DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.P. Organogênese e micropropagação da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, SP, v.21, n.1, p.60-64, 1999.
- FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO

- BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. Anais.... São Carlos: UFSCar, 2000. P.255-258.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, New York, v.50, p.151-158, 1968.
- GRATTAPAGLIA, D.; DE ASSIS, T.F.; CALDAS, L.S. Efeito residual de BAP e NAA na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus*. In: SIMPOSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2., 1987, Brasília, DF. Resumos... ABCTP, 1987. p.9.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. (eds). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1998. p.99-169.
- GUERRA, M.P.; COSTA, R.M.B.F.L.da. Micropropagação da figueira 'Roxo de Valinhos', através da cultura de meristemas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1987, Campinas. Anais...Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1988. v.2, p.465-467.
- HAELTERMAN, R.M.; DOCAMPO, D.M. *In vitro* propagation of mosaic-free (*Ficus carica* L.) cultivars, using thermotherapy and shoot tip cultures. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, Buenos Aires, v.25, n.3, p.15-22, 1994.
- HOFFMANN, A. Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira 'Marubakaido' e 'M-26'. Lavras: UFLA, 1999. 240p. (Tese- Doutorado em Fitotecnia).
- JAMES, D.J. Shoot and root initiation *in vitro* in the apple rootstock M.9 and the promotive effects of the phloroglucinol. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.56, n.1, p.15-20, 1981.
- KOZAI, T.A. Acclimatization of micropropagated plants. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.) *High-Tech and micropropagation*. Berlin: Springer-Verlag, 1991. v.17, p.127-141.
- KUMAR, V.; RADHA, A.; CHITTA, S. *In vitro* plant regeneration of fig (*Ficus carica* L. cv. Gular) using apical buds from mature trees. *Plant Cell Reports*, New York, v.17, p.717-720, 1998.

LANE, W.D. Regeneration of apple plants from shoot meristem tips. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v.13, n.3, p.281-5, 1978.

LEITE, G.B.; FINARDI, N.L.; FORTES, G.R.L. Efeito da concentração de BAP e ANA na multiplicação *in vitro* da pereira cv. Bartlett e do clone OH X F97. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v.21, n.4, p.436-441, out./dez. 1997.

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.

MAIORANO, J.A.; ANTUNES, L.E.C.; REGINA, M.A. de; ABRAHÃO, E; PEREIRA, A.F. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.188, p.22, 1997.

McCOWN, B.H.; SELLMER J.C. Media and physical environment. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (eds). **Cell and tissue culture in forestry, general principles and biotechnology**. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.1, p.1-16.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.153-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.6, p.473-479, June 1962.

MURITHI, M.; RAGAN, T.S. e WAITE, B.H. *In vitro* propagation of fig through shoot tip culture. **HortScience**, Madson, v.17, n.1, p.86-87, Feb. 1982.

NOVAK, F.J.; JUVOVA, Z. Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.18, n.3, p.231-240, Jan. 1983.

PAIVA, P.D. de O. Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Ait.) e controle de oxidação com identificação dos compostos liberados no meio de cultura. Lavras: UFLA, 1998. 84p. (Tese-Doutorado em Fitotecnia)

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações - introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159p.

- PEIXOTO, P.H. Micropropagação e termoterapia “*in vitro*” do porta-enxerto de videira ‘1103 Paulsen’. Lavras: UFLA, 1990. 94p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia).
- PEREIRA, F.M. Cultura da figueira. Piracicaba: Livroceres, 1981. 73p.
- PIERIK, R.L.M. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 356p.
- PONTIKIS, C.A. e MELAS, P. Micropropagation of *Ficus carica* L. *HortScience*, Madison, v.21, n.1, p.153, Feb. 1986.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v.78, p.437-442, 1977.
- RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F. Propagação da macieira cv. Gala através da cultura de meristemas. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, São Carlos, v.4, n.1, p.39-43, Jul. 1992.
- RIGITANO, O. Instruções para cultura da figueira. Campinas: IAC, 1964. 30p. (IAC. Boletim, 146).
- SCHUCH, M.W. Micropropagação de macieira cultivares Marubakaido (*Malus prunifolia*) e Megumi (*Malus domestica*, Borkh), Pelotas: UFPel. 1989. 98p. (Dissertação – Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado).
- SCHUCH, M.W.; PETERS, J.A. Multiplicação *in vitro* de brotações de macieira ‘Marubakaido’ (*Malus prunifolia*, Wild, Borkh.) e Megumi (*Malus domestica*, Borkh.). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.28, n.4, p.433-437, abr. 1993.
- SILVA, C.R. de R. e. Produção de figueira. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.9, n.102, p.30, jun. 1983.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symposium of Society for Experimental Biology*, v.11, p.118-131, 1957.
- TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. Micropropagação de plantas ornamentais. *Boletim Técnico do Instituto Agrônomo*, Campinas, SP, n.174, p.58-62, maio 1998.

- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds) Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. 433p.**
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.184-185.**
- VÁLIO, I.F.M. Auxinas. In: FERRI, M.G. Fisiologia vegetal. São Paulo: EPU, 1986. v.2, p.39-72.**
- WHITE, P.R. A handbook of plant tissue culture. Lancaster: Pensylvania, Costel e Company, 1943. p.273.**
- YUI, E. Multiplicação *in vitro* de porta- enxertos de macieira (*Malus domestica* Borkh.). Lavras: ESAL, 1990. 69p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).**
- YUI, E.; PASQUAL, M.; RAMOS, JD.; CHALFUN, N.N.J.; ISHIDA, J.S. Influência de reguladores de crescimento na proliferação *in vitro* de brotos de porta-enxertos de macieira 'M.7. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.28, n.5, p.597-602, maio 1993.**