

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

LEANDRO DILL

**ESTRATÉGIAS DE MICROPROPAGAÇÃO DE *Calibrachoa sellowiana* (SENDTN.)
WIJSMAN E *Rosmarinus officinalis* L.**

CURITIBANOS

2014

LEANDRO DILL

**ESTRATÉGIAS DE MICROPROPAGAÇÃO DE *Calibrachoa sellowiana* (SENDTN.)
WIJSMAN E *Rosmarinus officinalis* L.**

Trabalho de conclusão de curso submetido ao
Curso de Graduação em Agronomia da
Universidade Federal de Santa Catarina, *campus*
Curitibanos, para a obtenção do Grau de
Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Lírio Luiz Dal Vesco

CURITIBANOS

2014



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia

Rodovia Ulysses Gaboardi km3

CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC

TELEFONE (048) 3721-2178 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

LEANDRO DILL

ESTRATÉGIAS DE MICROPROPAGAÇÃO DE *Calibrachoa sellowiana* (SENDTN.) WIJSMAN E *Rosmarinus officinalis* L.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Colegiado do Curso de Agronomia, do Campus Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador(a): Lírio Luiz Dal Vesco

Data da defesa: 14 de novembro de 2014

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:

Presidente e Orientador: Lírio Luiz Dal Vesco

Titulação: Dr. Em Ciências

Área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais

Universidade Federal de Santa Catarina

Membro Titular: Paulo Cesar Poeta Fermino Junior

Titulação: Dr.

Área de concentração em Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal do Amazonas

Membro Titular: José Floriano Barea Pastore

Titulação: Dr.

Área de concentração em Botânica

Instituição: Universidade Estadual Feira de Santana

Local: Universidade Federal de Santa Catarina

Campus de Curitibanos

Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia

AGRADECIMENTOS

A UFSC, pelos apoios financeiros nas concessões das bolsas, permitindo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Curso de Graduação Agronomia da Universidade Federal de Santa Catarina, *Campus* Curitibanos.

Ao Prof. Dr. Lírio Luiz Dal Vesco pela orientação, pela oportunidade e confiança na realização deste trabalho, por sua compreensão, paciência e amizade desfrutada por todo esse período.

Aos professores e amigos do Curso de Agronomia.

Aos meus familiares, pelo apoio e incentivo constantes durante o curso: de coração, à minha namorada Vânia que me apoiou e teve paciência quando eu estava passando por momentos difíceis; a minha Mãe Janete por sempre me apoiar e nunca desistir de sonhar comigo, a meu pai Luiz por sempre dar uma palavra de segurança e ter me educado com muita sabedoria, as minhas irmãs Leila, Lilian e Luiza Victoria que possam sentir orgulho do meu trabalho.

E a Deus e aos bons espíritos, pela inspiração, oportunidade e proteção. Pela saúde, excelente família e amigos que tive a felicidade conviver e de encontrar nesse período.

Por fim, a todos que participaram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

RESUMO

A micropropagação de plantas é uma estratégia, que se vem ao encontro das necessidades dessas duas espécies aqui apresentadas o *Rosmarinus officinalis* e *Calibrachoa sellowiana* ambas com potencial econômico a ser explorado. O Alecrim (*R. officinalis*) planta de origem do Mediterrâneo, possui características medicinais, podendo ser amplamente utilizado na indústria de cosméticos e medicamentos. A Petúnia (*C. sellowiana*) com seus atributos ornamentais, com valor de conservação e pioneira na recuperação de áreas degradadas e, por se tratar de uma espécie nativa dos campos sulinos, do Bioma Mata Atlântica tem um alto valor ecológico. Além disto, estas duas espécies possuem características para ser adotada como fonte de renda alternativa para agricultores. No presente trabalho segmentos nodais e apicais foram extraídos de plantas matrizes de *Rosmarinus officinalis* e de *Calibrachoa sellowiana*, foram utilizados em diferentes protocolos para a micropropagação através do cultivo em meio de cultura com diferentes tipos e concentrações de fitorreguladores, durante a indução, regeneração e alongamento de brotos. Para a introdução *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* foram testados 11 tratamentos: 1) MSB isento de fitorreguladores; 2) ácido naftalenoacético - ANA (1 μM); 3) ANA (2 μM); 4) a combinados de ANA (1 μM) com Benzilaminopurina - BAP (1 μM); 5) ANA (1 μM) com BAP (4 μM); 6) ANA (2 μM) com BAP (1 μM); 7) ANA (2 μM) com BAP (2 μM); 8) ANA (2 μM) com BAP (4 μM); 9) BAP (1 μM); 10) BAP (2 μM) e; 11) BAP (4 μM). Para promover a proliferação e a regeneração múltiplas de brotos, os calos e as brotações, foram repicados em três diferentes meios de cultura: 1) ANA (2 μM) + BAP (4 μM); 2) MS + ANA (0,1 μM) + BAP (1 μM) e; 3) MS isento de fitorreguladores. Em *R. officinalis* observou-se que mais de 43,6% dos explantes apresentaram um tipo de contaminação e 30 % destes revelaram a presença de oxidação e a formação de calo e brotos foi de 56,4%, após 5 semanas de cultivo. A permanência de contaminações com bactérias endógenas evidencia a necessidade de uso de antibióticos no meio de cultivo. Além disto, a alta porcentagem de oxidação e necrose das culturas sugere o uso de antioxidantes durante os subcultivos. Portanto uma das possíveis estratégias para a micropropagação do alecrim é pela via de organogênese direta, pela ocorrência de regeneração de brotos diretamente dos explantes e pela via indireta, com a indução de calo seguida da regeneração de brotos. Em *C. sellowiana*, a indução e estabelecimento *in vitro* das culturas foi conduzida em seis tratamentos, com a suplementação ao meio de cultura básico MSB com diferentes combinações de ácido naftalenoacético - ANA (0 e 0,1 μM) combinados com Benzilaminopurina - BAP (0; 0,5 e 1,0 μM). Regeneração e Multiplicação de Brotos. Brotações e culturas nodulares induzidas e estabelecidas *in vitro*, foram repicadas para promover a proliferação e a regeneração de brotações múltiplas, em dois diferentes meios de cultura básico MSB suplementado com as combinações dos fitorreguladores: 1) ANA (0,1 μM) e BAP (0,5 μM) e; 2) ANA (0,1 μM) e BAP (1,0 μM). Para a regeneração e o alongamento, os brotos foram repicados para frascos tipo conserva (340 ml) em meio de cultura MSB e isento de fitorreguladores. Brotações com 3-5 cm de altura foram retiradas das folhas para evitar a desidratação e imersa em solução de Ácido Indolilbutírico – AIB (50 ppm) para a indução de enraizamento e transferidas para substratos para promover a aclimatização. O uso do meio de cultura MSB suplementado com ANA (0,1 μM) mais BAP (1,0 μM) promoveu a alta produção de brotos, e o surgimento de culturas do tipo nodular, que posteriormente regeneram em brotações múltiplas. As brotações e estas culturas do tipo nódulos induzidas e estabelecidas *in vitro*, quando subcultivadas com ANA (0,1 μM) mais BAP (1,0 μM) promoveram uma alta regeneração de brotos. Para a altura (cm) das plantas, as médias mais elevadas foram obtidas nos tratamentos contendo ANA (0,1 μM) e em MS sem a suplementação de fitorreguladores. Enquanto que, a suplementação ao MSB com ANA (0,1 μM) em combinação com BAP resultou em média maior e significativo número médio e micro brotos por explantes. Portanto, a estratégia para a micropropagação da *C. sellowiana* se caracteriza pelo modelo da organogênese via formação de nódulos como às culturas nodulares.

Palavras-Chave: Petúnia, Alecrim, Cultivo *in vitro*, Organogênese, Culturas Nodulares.

ABSTRACT

The micropropagation of plants is a strategy that meets the needs of both species presented here the *Rosmarinus officinalis* and *Calibrachoa sellowiana* both with economic potential to be exploited. The Rosemary (*R. officinalis*) Mediterranean plant origin, has medicinal properties, and can be widely used in the cosmetic and pharmaceutical industry. *Petunia* (*C. sellowiana*) with their ornamental attributes, with conservation and pioneering value in the recovery of degraded areas and, because it is a native species of southern fields, the Atlantic Forest biome has a high ecological value. In addition, these two species have characteristics to be adopted as alternative source of income for farmers. In this study nodal segments and apical were taken from mother plants of *Rosmarinus officinalis* and *sellowiana Calibrachoa*, were used in different protocols for micropropagation through the culture in culture medium with different types and concentrations of growth regulators, during induction, regeneration and elongation sprouts. For in vitro introduction of *Rosmarinus officinalis* were tested 11 treatments: 1) MSB free of growth regulators; 2) naphthaleneacetic acid - ANA (1 mM); 3) ANA (2 mM); 4) the combined ANA (1 mM) with Benzylaminopurine - BAP (1 mM); 5) ANA (1 mM) with BAP (4 mM); 6) ANA (2 uM) with BAP (1 mM); 7) ANA (2 uM) with BAP (2 mM); 8) ANA (2 uM) with BAP (4 mM); 9) BAP (1 mM); 10) BAP (2 mM) and; 11) BAP (4 mM). To promote the proliferation and multiple shoot regeneration, callus and shoots were transferred in three different culture media: 1) ANA (2 mM) + BAP (4 mM); 2) MS + NAA (0.1 mM) + BAP (1 mM) and; 3) MS free of growth regulators. In *R. officinalis* noted that more than 43.6% of the explants had a type of contamination, and 30% of them showed the presence of oxidation and the formation of callus and shoots was 56.4%, after 5 weeks of cultivation. The permanence of contamination with endogenous bacteria highlights the need for antibiotics in the culture medium. Furthermore, the high percentage of oxidation and necrosis of the cultures suggests the use of antioxidants Durantes the subcultures. So one of the possible strategies for the rosemary micropropagation is via direct organogenesis, the occurrence of shoot regeneration directly from explants and by indirect means, with the induction of callus regeneration then shoots. *C. sellowiana*, induction and in vitro establishment of the cultures were conducted in six treatments with the supplementation MSB basic culture medium with different combinations of naphthaleneacetic acid - NAA (0 and 0.1 mM) combined with benzylaminopurine - BAP (0, 0.5 and 1.0 mM). Regeneration and multiplication of shoots. Shoots and established in vitro and induced nodule culture, were transplanted to promote proliferation and regeneration of multiple shoots in two basic different ways of MSB culture supplemented with combinations of plant growth regulators: 1) NAA (0.1 mM) and BAP (0.5 mM) and; 2) ANA (0.1 mM) and BAP (1.0 mM). For regeneration and stretching, the shoots were transferred to preserve type bottles (340 ml) in the middle of MSB culture and free of growth regulators. Shoots with 3-5 cm were taken from the sheets to prevent dehydration and immersed in acid solution indole butyric - IBA (50 ppm) to induce rooting and transfer to substrates to promote acclimatization. The use of MSB culture medium supplemented with NAA (0.1 mM) more BAP (1.0 mM) promoted the high production of shoots, and the emergence of the nodular type cultures, which subsequently regenerate multiple shoots. Shoots and these cultures type nodules induced and established in vitro, when subcultured with ANA (0.1 mM) more BAP (1.0 mM) promoted a high shoot regeneration. For height (cm) of the plants, the highest means were obtained from treatments with NAA (0.1 mM) and MS without supplementation of growth regulators. Whereas supplementation with the MSB NAA (0.1 mM) in combination with BAP resulted in higher mean and median and the mean micro shoots per explants. Therefore, the strategy for micropropagation of *C. sellowiana* is characterized by the model of organogenesis via lumps as the nodule culture.

Keywords: *Petunia*, Rosemary, in vitro cultivation, Organogenesis, Culture nodular.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AG₃ – ácido giberélico

ANA – Ácido Naftalenoacético

ANOVA - Análise da Variância

Atm - Atmosfera

BAP – 6-benzilaminopurina

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

HCl - Ácido Clorídrico

μM – micro Molar

mg - miligrama

ml - mililitro

mm - milímetro

Mm - millimolar

MSB - Meio de cultura MS Básico (Murashige e Skoog 1962)

NaOCl – Hipoclorito de Sódio

NaOH - Hidróxido de Sódio

pH - Potencial de Hidrogênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivo.....	2
1.1.1. Objetivo Geral	2
1.1.2. Objetivos Específicos	2
2. CAPITULO 1 - MICROPROPAGAÇÃO DO ALECRIM (<i>Rosmarinus officinalis</i>): ESPÉCIE DE INTERESSE MEDICINAL	3
2.1. Introdução	3
2.2. Material E Métodos.....	6
2.2.1. Material Vegetal	6
2.2.2. Indução e estabelecimento <i>in vitro</i>	6
2.2.3. Regeneração e Multiplicação de Brotos	7
2.2.4. Análise Estatística	7
2.3. Resultados e Discussão	7
2.4. Conclusão.....	12
3. CAPITULO 2 - MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Calibrachoa sellowiana</i> (SENDTN.) WIJSMAN: ESPÉCIE NATIVA DOS CAMPOS SULINOS.....	16
3.1. Introdução	16
3.2. Material E Métodos.....	18
3.2.1. Material Vegetal e ambiente de cultivo.....	18
3.2.2. Indução e estabelecimento <i>in vitro</i>	19
3.2.3. Regeneração e Multiplicação de Brotos	19
3.2.4. Alongamento dos brotos.....	20
3.2.5. Enraizamento <i>ex vitro</i> e aclimatização.....	20
3.2.5. Análise Estatística	20
3.3. Resultados e Discussão	20
3.3.1. Indução e estabelecimento <i>in vitro</i>	20
3.3.2. Regeneração e multiplicação de brotos	23
3.3.3. Enraizamento <i>ex vitro</i> e aclimatização.....	25
3.4. Conclusão.....	26

1. INTRODUÇÃO

Tanto *Calibrachoa sellowiana* e *Rosmarinus officinalis* são espécies que precisam ser estudadas. Em *R. officinalis* o valor medicinal e a dificuldade de obtenção de mudas justificam a importância do estudo de formas alternativas de propagação comercial para esta espécie, incluindo a micropropagação, visando selecionar linhagens de alta qualidade para o plantio extensivo e a extração adequada de fitofármacos. Especificamente, para *R. officinalis*, um número restrito de publicações isoladas tem sido dedicado à propagação *in vitro*, entre as quais se destacam os trabalhos de Misra & Chaturvedi (1984), Komali & Shetti (1998), Caruso *et al.* (2000). Entretanto, tais trabalhos apresentam protocolos pouco detalhados, além de serem específicos para genótipos adaptados a ambientes europeus e asiáticos. E por sua vez a *Calibrachoa* vem em direção da conservação do recurso natural e seu valor ornamental. Por se tratar de uma espécie ainda pouco domesticada e constitui de uma paisagem natural, o processo de micropropagação se faz também importante. E a espécies *Calibrachoa*, em muitas situações esta presentes em campos com afloramento de rochas e solos com pedregosidade (STEHMANN, 1999). Segundo Vendrusculo (2009) a ocorrência da espécie em áreas antropizadas, que acabam se diferenciando em espécies pioneiras ou colonizadoras de áreas abertas (clareiras e bordas de floresta) ou ate mesmo em paisagens degradadas.

Para as duas espécies a micropropagação é uma eficiente ferramenta para clonar plantas em escala comercial. Os explantes são cultivados assepticamente em meio de cultura, permitindo uma interação controlada entre fatores abióticos e bióticos, que pode dar origem a plantas geneticamente superiores multiplicadas massivamente. Diversos explantes podem ser utilizados para o início de uma propagação *in vitro* de uma planta, entretanto, procura-se selecionar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar totipotência, tais como gemas apicais, gemas axilares e sementes (TORRES *et al.*, 2000).

A espécie *C. sellowiana* são arbustivas, subarbustivas ou herbáceas e, em geral, possuem menos de 70 cm de altura. As espécies arbustivas e subarbustivas apresentam caule com base espessada e lignificada (STEHMANN, 1999). *Calibrachoa* pertence à família Solanaceae, tribo Nicotianeae, subfamília Cestroideae, e a maioria das suas 24 espécies ocorrem na região subtropical da América do Sul (STEHMANN, 1999). Mäder (2008 apud TSUKAMOTO *et al.* 2002) relata que o gênero ocorre exclusivamente no sudeste da América do Sul, de Minas Gerais até o Uruguai, com abundância máxima nos estados brasileiros do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

Já a espécie *R. officinalis*, conhecida popularmente por alecrim, é um subarbusto lenhoso da família Lamiaceae, originário da Região Mediterrânea da Europa. As folhas de *R. officinalis* são

lineares, coriáceas, muito aromáticas e perenes. Suas flores, hermafroditas, encontram-se reunidas em espiguihas terminais azuladas ou lilás, pequenas e muito aromáticas (LORENZI & MATOS, 2002) Além de sua utilização como cobertura vegetal para proteção contra erosão (CARUSO *et al.*, 2000), a espécie é conhecida por suas propriedades nutricionais e medicinais. Dentre os benefícios, destacam-se suas propriedades antioxidantes, antissépticas, vasodilatadoras, diuréticas, antiespasmódicas, antibacterianas, antifúngicas, tônicas e estimulantes. Do ponto de vista fitoquímico, o alecrim produz flavonóides, flavonas metoxiladas e ácidos fenólicos, sobretudo derivados caféicos, tais como o ácido caféico, o ácido clorogênico e o ácido rosmarínico. O alecrim caracteriza-se, ainda, pela presença de diterpenos tricíclicos e triterpenos (NASCIMENTO *et al.*, 2001).

Atualmente, os principais produtores de alecrim são a Europa e o norte da África. No Brasil, o cultivo encontra obstáculos, principalmente relacionados às condições climáticas. É uma espécie de difícil reprodução por sementes e intolerante a invernos úmidos, característicos da região Sul do Brasil (COSTA & DROSTE, 2010). Portanto, ambas as espécies utilizadas neste trabalho tem potencial de se tornarem fonte de renda para pequenos agricultores uma vez que se estabeleça estratégias de propagação para garantir fácil acesso a esses materiais.

1.1. Objetivo

1.1.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo identificar estratégias de micropropagação das espécies *Calibrachoa sellowiana* e *Rosmarinus officinalis* que resultem em uma base para conservação e propagação massal dessas espécies.

1.1.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar o processo de desinfestação na introdução *in vitro* de segmentos nodais e apicais de *Calibrachoa sellowiana* e *Rosmarinus officinalis*.
- b) Avaliar estratégias de organogênese para a micropropagação de *Calibrachoa sellowiana* e *Rosmarinus officinalis*;
- c) Avaliar os efeitos das concentrações e combinações de BAP E ANA no estabelecimento de protocolos para a micropropagação em escala de *Calibrachoa sellowiana* e *Rosmarinus officinalis*.

2. CAPÍTULO 1 - MICROPROPAGAÇÃO DO ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*): ESPÉCIE DE INTERESSE MEDICINAL

2.1. Introdução

A família Lamiaceae apresenta um número importante de espécies com valor econômico e sendo utilizado na medicina popular e como condimentos. Nesta família há espécies cujo hábito varia do herbáceo ao arbóreo; os caules são frequentemente quadrangulares em seções transversais (JUDD *et al.*, 2009). De acordo com a descrição de Simpson (2006), suas folhas são simples, opostas e verticiladas. Possuem inflorescências e suas flores são bissexuais, a maioria zigomorfa, bracteada ou bracteolada. O fruto é esquizocarpo de, usualmente, noz, uma drupa ou baga.

Esta família apresenta distribuição cosmopolita (KRUPPA & RUSSOMANNO, 2008). A família compreende 251 gêneros com cerca de 6700 espécies distribuídas em todo o mundo, sendo o maior centro de dispersão a região do Mediterrâneo (SIMPSON, 2006). Já no Brasil, a sua distribuição ocorre em cerca de 350 espécies inseridas em 26 gêneros (SOUZA & LORENZI, 2005) sendo que muitas destas espécies são plantas medicinais e produtoras de óleos essenciais, utilizadas também como condimentos ou como flores ornamentais (BARROSO, 2002).

Dentre os gêneros introduzidos, vários podem ser cultivados para a utilização como condimentos, como *Ocimum* (alfavacas), *Mentha* (hortelãs, mentas) ou na medicina popular, como *Origanum* (orégano, magerona), *Melissa* (erva-cidreira) e *Rosmarinus* (alecrim). Há também uma ampla variedade de gêneros que produzem óleo essencial de grande aplicação, como o *Pogostemum* (patchuli), e a *Lavandula* (alfazema). Em virtude disso a família possui uma significativa importância econômica.

A principal forma de propagação da maioria das plantas medicinais é a assexuada, por meio de estaquias, porém este tipo de propagação nos remete a vários inconvenientes como o curto tempo de armazenamento dos materiais de propagação e o grande volume de material a ser manuseado. No caso do alecrim, o principal método de propagação também é o assexuado devido à dormência apresentada por suas sementes (COSTA & DROSTE, 2010).

Dentre as espécies mencionadas anteriormente destaca-se o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) devido sua vasta utilidade na medicina popular, culinária e indústria cosmética. Castro *et al.* (2001) define uma planta medicinal como qualquer vegetal que produza substâncias biologicamente ativas, em quantidade considerável, que podem ser utilizadas direta ou indiretamente como medicamentos.

O *R. officinalis* é originário da Região Mediterrânea, popularmente conhecida como alecrim, rosmarino, erva da graça, erva coroada, alecrinzeiro ou libanotis. Possui porte subarborescente lenhoso, ereto, pouco ramificado, de até 1,5 m de altura. Suas folhas são lineares, coriáceas e muito

aromáticas, medindo 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura. Suas flores são azuladas, pequenas e de aroma forte e muito agradável (LORENZI & MATOS, 2002).

É a planta aromática mais difundida no Mediterrâneo, pois além de existir em estado silvestre, é cultivado para diversos fins desde tempos remotos, como na Grécia antiga, onde era considerado um fortificante para o cérebro e a memória (GIACOMETTI, 1989).

Diversas farmacopéias citam o uso de alecrim e ele é amplamente utilizado na medicina popular e na fitoterapia como estimulante, aromático, antioxidante, antimicrobiana, antitumoral (SILVA *et al*, 2011), vasodilatador, diurético, antiespasmódicas (COSTA & DROSTE, 2010) hipotensor, analgésico, colerético/colagogo, sudorífico, possui propriedades anti-caspa, entre outros usos (LAINETTI & BRITO, 1979). Silva *et al* (2008) testou o efeito antimicrobiano do extrato hidroalcoólico de alecrim sobre cepas de *Streptococcus mitis* IATCC9811, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 e *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Os resultados demonstraram a eficácia da atividade antimicrobiana do extrato do alecrim sobre as linhagens ensaiadas.

As atividades antioxidantes podem ser atribuídas a presença de rosmanol, diterpenos, rosmaridifenol e rosmariquinona. Já as propriedades antimicrobianas podem estar relacionadas com a presença de borneol, pinenos, cineol e cânfora (PORTE & GODOY, 2001). Desta forma, pelo potencial farmacológico e econômico do alecrim torna a cultura de tecidos uma estratégia importante para a propagação *in vitro* favorecendo, portanto, o desenvolvimento de plantas mais adaptadas a condições brasileiras.

A técnica de cultura de tecidos vegetais consiste no isolamento de explantes, que são pequenos fragmentos de tecido vegetal vivo, na desinfestação e subsequente cultivo asséptico por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado, objetivando-se obter uma nova planta idêntica a original, mantendo-se o genótipo idêntico da planta matriz (TORRES *et al*, 2000).

Existem inúmeros fatores que afetam a técnica de cultura de tecidos vegetais, dentre eles estão o genótipo da planta mãe, a fonte de explantes e a condição física adicionada ao meio em que a cultura foi estabelecida (CALDAS *et al*, 1998). Variedades de uma mesma espécie podem responder de maneira distinta ao cultivo (MANTELL *et al*, 1994). Na escolha do explante, deve-se utilizar tecidos jovens e em crescimento, pois os tecidos em senescência já perderam grande parte de seus nutrientes. Os meios de cultura, por sua vez, deve conter os sais minerais, nitrogênio, uma fonte de carbono, vitaminas e reguladores de crescimento. Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. Não há uma formulação padrão, mas o meio MS

(MURASHIGE & SKOOG, 1962), com suas modificações e diluições, tem sido utilizado com sucesso para diversas espécies (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A partir da utilização dos meios de cultura se tornou possível a identificação das rotas morfogênicas, como a organogênese direta – onde o uso de gemas ou primórdios de gemas pré-existentes induz à proliferação. Ou, também, pela organogênese indireta – Onde novas gemas e eixos caulinares podem ser induzidos e formados a partir de tecidos não organizados (calos) originados de explantes de diferentes origens (GUERRA & NODARI, 2006).

A organogênese relaciona-se com a obtenção de eixos caulinares monopolares originados de gemas pré-existentes ou neo-formadas. Estes eixos caulinares são induzidos ao enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* resultando em plântulas completas que podem ser então aclimatizadas (GUERRA & NODARIA, 2006). Na organogênese direta a partir de um explante primário há a formação de um eixo caulinar a partir de gemas apicais, laterais ou axilares. Na organogênese indireta ocorre a desdiferenciação do explante, resultando na formação de calos, que podem ser definidos como a proliferação de células não diferenciadas massas, originado meristemóides (THORPE, 1980). Para finalidades de micropropagação clonal a formação de calos é indesejável uma vez que a constituição cromossômica deste material é, em geral, instável, podendo originar variantes genéticas, por meio de um processo chamado variação somaclonal (GUERRA & NODARIA, 2006). Neste caso, o período de crescimento desorganizado deve ser o menor possível, ou preferencialmente eliminado (STREET, 1977; MURASHIGE, 1977).

Para ocorrer o desenvolvimento ou a entrada de atividade de um determinado hormônio é necessário a sinalização específica por reguladores de crescimento em sítios regulador por kinases. O controle químico da diferenciação da parte aérea foi primeiramente observado em cultura de calo de tabaco. Foi observada inibição na formação de gemas por auxinas, e reversão deste efeito estimulando brotações utilizando-se adenina bem como o fosfato inorgânico. Esta foi a constatação de que o processo de organogênese *in vitro* é controlado por substâncias hormonais sendo que o desenvolvimento de parte aérea, raiz ou calo é determinado pelo balanço entre auxinas e citocininas. O balanço de auxinas/citocininas em alto/baixo favorecem o enraizamento e o balanço inverso promove a formação de parte aérea. Concentrações iguais promovem a produção de calos (GUERRA & NODARIA, 2006).

Desta forma, o estudo desenvolvido neste trabalho teve por objetivo identificar os processos para a micropropagação de *Rosmarinus officinalis* e avaliar os efeitos das concentrações e combinações de BAP E ANA no estabelecimento de protocolos para a micropropagação em escala.

2.2. Material E Métodos

2.2.1. Material Vegetal

Plantas matrizes de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) cultivadas em vasos (Fig. 1A). E mantidas no ambiente do Laboratório de Biotecnologia e Genética do Campus da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Curitiba, região do Planalto Catarinense, foram à fonte de explantes para a introdução *in vitro*. Os experimentos foram conduzidos em ambiente de câmara BOD com temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 14 h de luz, no Laboratório de Biotecnologia e Genética do Campus Curitiba, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no período de novembro de 2013 a junho de 2014.

O meio de cultura básico utilizado no cultivo *in vitro* foi composto pela formulação salina MS (Murashige & Skoog, 1962), adicionados de vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951), 30 g L^{-1} de sacarose e com $7,5\text{ g L}^{-1}$ de Agar-agar, aqui denominado de MSB. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, a 1,3 atm., por 15 minutos. O processo de inoculação das culturas foi realizado em uma câmara de fluxo laminar. E as culturas foram mantidas em ambiente de câmara BOD com temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 14 horas.

2.2.2. Indução e estabelecimento *in vitro*

Segmentos nodais e ápices caulinares excisados com 1,0 a 1,5 cm de comprimento, contendo duas ou três gemas foram à fonte de explantes utilizados para a introdução *in vitro*. Após a excisão os explantes foram lavados em água corrente e com duas gotas do surfactante Tween-20 0,1% (v/v) por cinco minutos. Em câmara de fluxo laminar foram submetidos a um processo de desinfestação, sob agitação, através da imersão em álcool etílico 70% (v/v) por um minuto, com água sanitária a 40% (v/v) contendo 1% de cloro ativo por 20 minutos e em seguida três enxágües em água autoclavada. Para a indução de brotos, os segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio (18 x 100 cm), contendo 5 ml de meio de cultura com diferentes combinações de fitorreguladores.

O desenho experimental foi completamente casualizado com 11 tratamentos, com a suplementação ao meio de cultura básico MSB com diferentes concentrações e combinações de fitorreguladores: 1) MSB isento de fitorreguladores; 2) ácido naftalenoacético - ANA (1 μM); 3) ANA (2 μM); 4) a combinados de ANA (1 μM) com Benzilaminopurina - BAP (1 μM); 5) ANA (1 μM) com BAP (4 μM); 6) ANA (2 μM) com BAP (1 μM); 7) ANA (2 μM) com BAP (2 μM); 8) ANA (2 μM) com BAP (4 μM); 9) BAP (1 μM); 10) BAP (2 μM) e; 11) BAP (4 μM). Cada

unidade experimental foi constituída de cinco tubos de ensaio contendo um explante, de 0,8 a 1,0 cm contendo duas gemas por explantes e repetidos três vezes. Após duas, três e quatro semanas de cultivo foram coletados dados de altura de brotos (cm), número de brotos e números de nós por explantes. Dados relevantes durante o cultivo foram registrados por fotomicrografia.

2.2.3. Regeneração e Multiplicação de Brotos

Brotações e calos induzidas e estabelecidas *in vitro*, foram repicadas para promover a proliferação e a regeneração de brotações múltiplas, em três diferentes meios de cultura: 1) ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M); 2) MS + ANA (0,1 μ M) + BAP (1 μ M) e; 3) MS isento de fitorreguladores.. Dados relevantes durante o cultivo foram registrados por fotomicrografia.

2.2.4. Análise Estatística

Os dados coletados de cada parâmetro foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste Student-Newman-Keuls (SNK-5%) de separação de médias, quando necessário os dados originais foram transformados em $(x+0,5)^{0,5}$ ou $\log(x+1)$, segundo as recomendações de Compton (1994).

2.3. Resultados e Discussão

Segmento nodal e ápices caulinares foram estabelecidos em condições assépticas após 2 semanas de cultivo (Fig. 1B). Observou-se também que mais de 43,6% dos explantes apresentaram algum tipo de contaminação e 30 % destes revelaram a presença de oxidação (Fig. 2). Dalmas *et al* (2006) com a mesma espécie observou uma média 42% de contaminação em explantes inoculados, principalmente por fungos filamentosos.

Além disto, em três semanas de cultivo já se observou o início da indução de calo e brotos, principalmente quando os explantes foram cultivados em meio de cultura MS suplementado com 2 μ M de BAP (Fig. 1C) e que, em 5 semanas de cultivo observou-se a formação de calo e brotos em 56,39% (Fig. 1D, Fig. 2) dos explantes inoculados. Em cultura de tecido de *Manihot esculenta*, Lima et al.(2002) detectou que somente a partir de 14 dias e em todos os períodos de coletas subsequentes, ouve a ocorrência de indução de calos. A suplementação do meio de cultura com BAP induziu a formação de calos (LIMA et al. 2002).

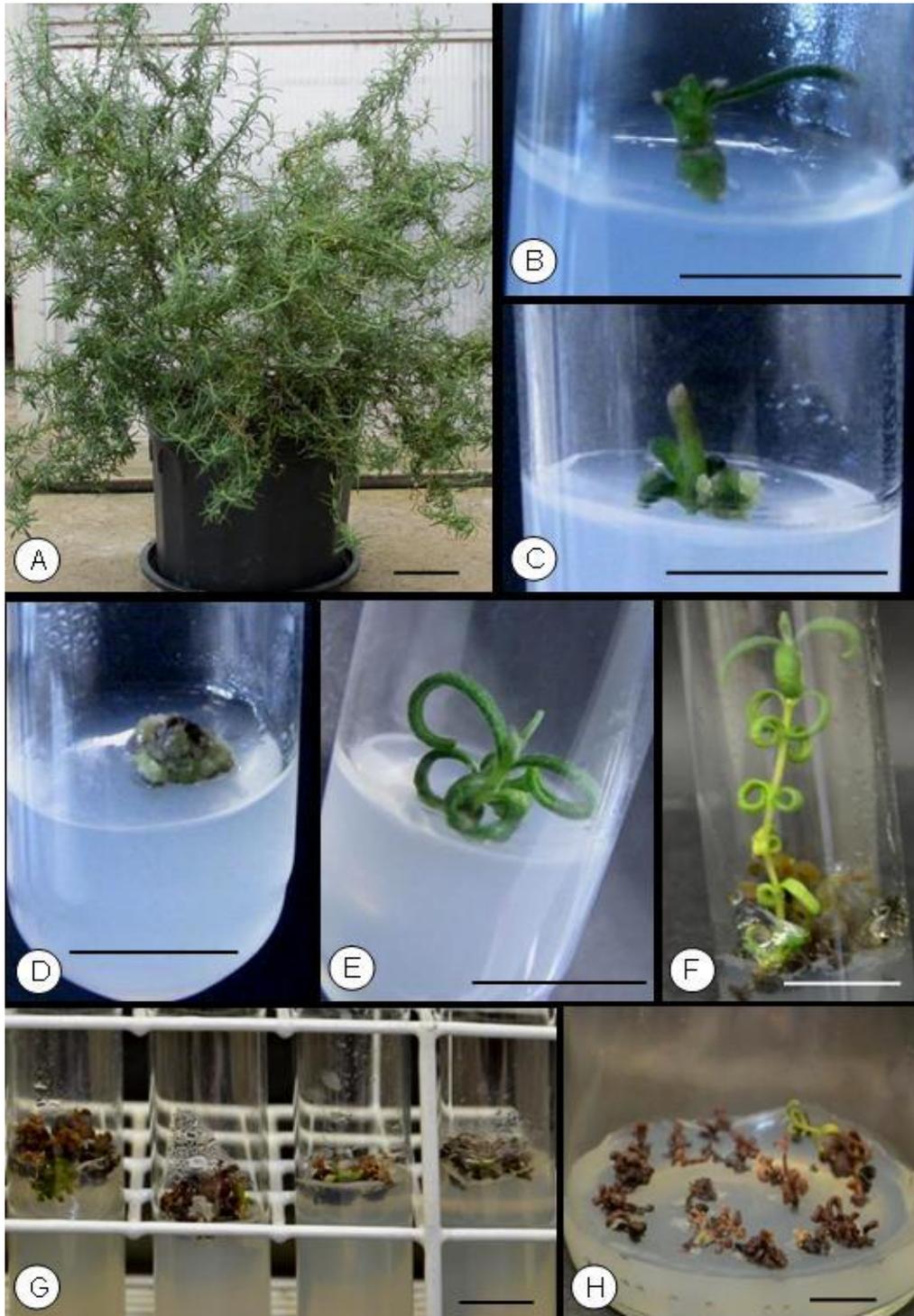


Figura 1. Cultivo *in vitro* de *Rosmarinus officinalis*. A) Planta matriz cultivada em vaso em casa de vegetação; B) Segmento nodal estabelecido em condições assépticas, após 2 semanas de cultivo; C) Início da indução de calo em meio de cultura MS suplementado com BAP (2 μ M), após 3 semanas de cultivo; D) Indução de calo quando cultivado em meio de cultura MS suplementado com BAP (2 μ M), após 5 semanas de cultivo; E) Desenvolvimento de brotos em meio de cultura MS suplementado com ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M); F) Alongamento de brotos em meio de cultura MS + ANA (0,1 μ M) + BAP (1 μ M), após 11 semanas; G-H) Brotos e calos com necrose, após 11 semanas de cultivo em: G) MS + ANA (0,1 μ M) + BAP (1 μ M) e; H) MS isento de fitorreguladores. Barra: A = 8,0 cm; B-H = 1,0 cm.

No presente trabalho foi possível observar diferenças significativas entre as médias relacionadas ao número de brotos por explantes (Fig. 3) e revelou um forte efeito positivo quando foi combinado fitorreguladores ANA e BAP. As maiores taxas de multiplicação de brotos e significativas ($P < 0.05$) foram observadas quando se utilizou como meio de cultura a formulação salina MS, suplementada com 1 μM de ANA mais 4 μM de BAP ou 2 μM de ANA mais 2 μM de BAP ou 2 μM de ANA mais 4 μM de BAP ou 1 μM de ANA mais 1 μM de BAP, 2 μM de BAP ou 2 μM de ANA mais 1 μM de BAP (Fig. 3).. Em bromélias *Aechmea fasciata*, Dal Vesco et al (2001) obtiveram elevadas taxas de multiplicação de brotos quando utilizaram o meio de cultura com a formulação salina MS, suplementada com 2 μM de ANA mais 4 μM de BAP e 1 μM de ANA mais 2 μM de BAP.

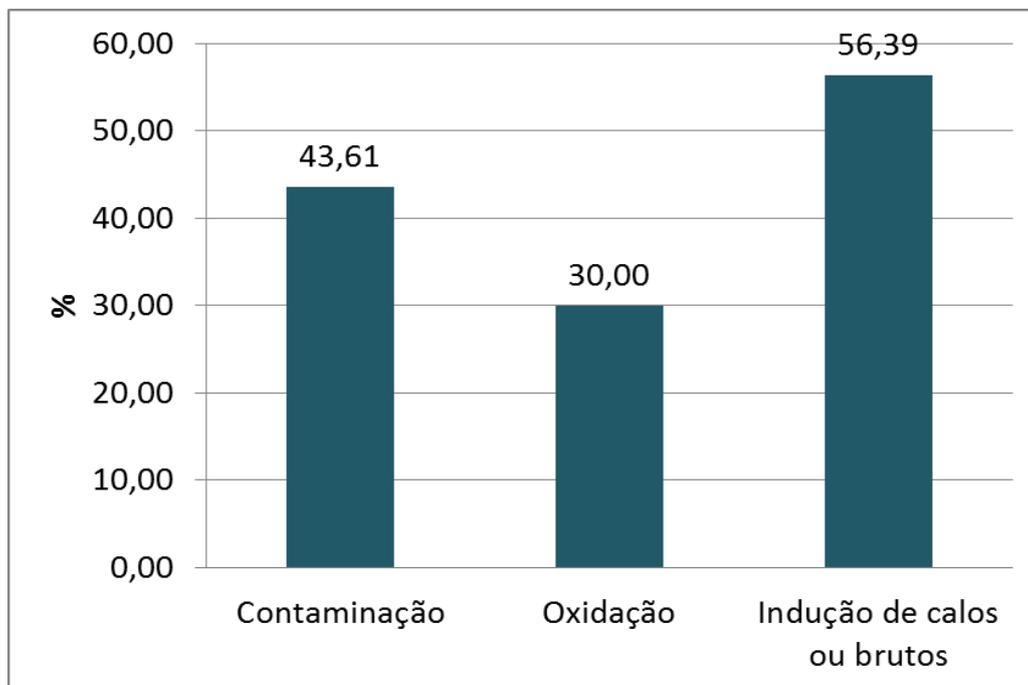


Figura 2. Porcentagem média de contaminação por fungos e bactérias, de oxidação e de indução de calos ou brotos, em resposta a introdução *in vitro* de *Rosmarinus officinalis*, após 2 semanas de cultivo em meio de cultura básico MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com diferentes doses e tipos de fitorreguladores.

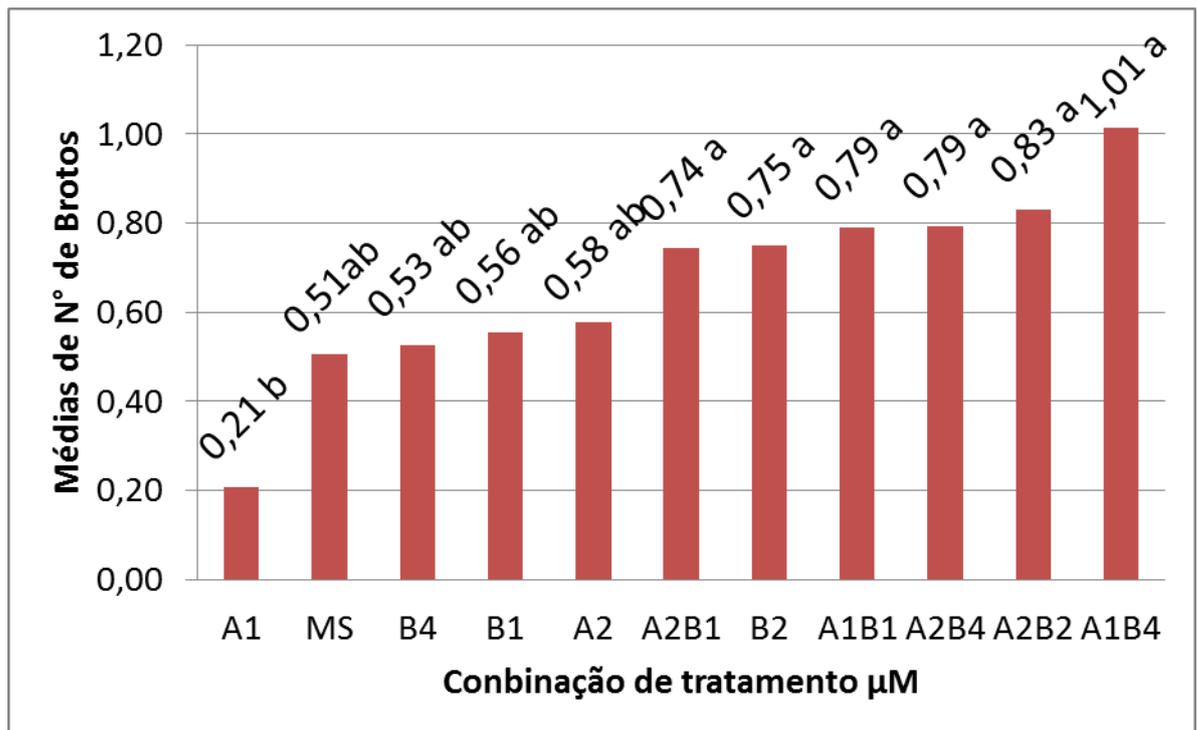


Figura 3. Número médio de brotos de *Rosmarinus officinalis* em resposta ao meio de cultura básico MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado ou não com os fitoreguladores ANA (0 e 0,1 μM) combinado com BAP (0; 0,5 e 1,0 μM), após quatro semanas de cultivo. Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas dentro de cada tratamento de cultivo, indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). CV(%) = 13,66 Para dados transformados em $(x + 0,5)^{0,5}$.

Além disto, observou também no presente trabalho que, uma das estratégia de propagação do Alecrim ocorre pelo desenvolvimento da cultura de calo e seguido da regeneração de brotos. Os tratamentos onde havia a combinação de ANA (2 μM) + BAP (4 μM) ocorreu o melhor desenvolvimento de brotos (Fig. 1E). No entanto, para obter o alongamento de brotos foram necessários subcultivos em meio de cultura MSB, suplementado com ANA (0,1 μM) + BAP (1 μM) (Fig. 1F). A formação de calos e início de brotação, apresentando necrose do tecido em meio de cultura MSB + BAP 2 μM .

A suplementação de ANA ao meio de cultura, não mostrou ser tão eficiente quanto ao uso de citocinina BAP utilizada para a indução de calos na *Manihot esculenta*. No entanto, em associação com o BAP, apresentou efeito positivo (LIMA et al. 2002). Em *Ginkgo biloba* observou-se que a combinação citocinina (BAP) e auxina (ANA) foi efetiva na formação de calos (SEXTO et al, 2014). Jardim et al. (2010) também ressalta que a combinação de BAP com ANA estimulou maior numero de brotos.

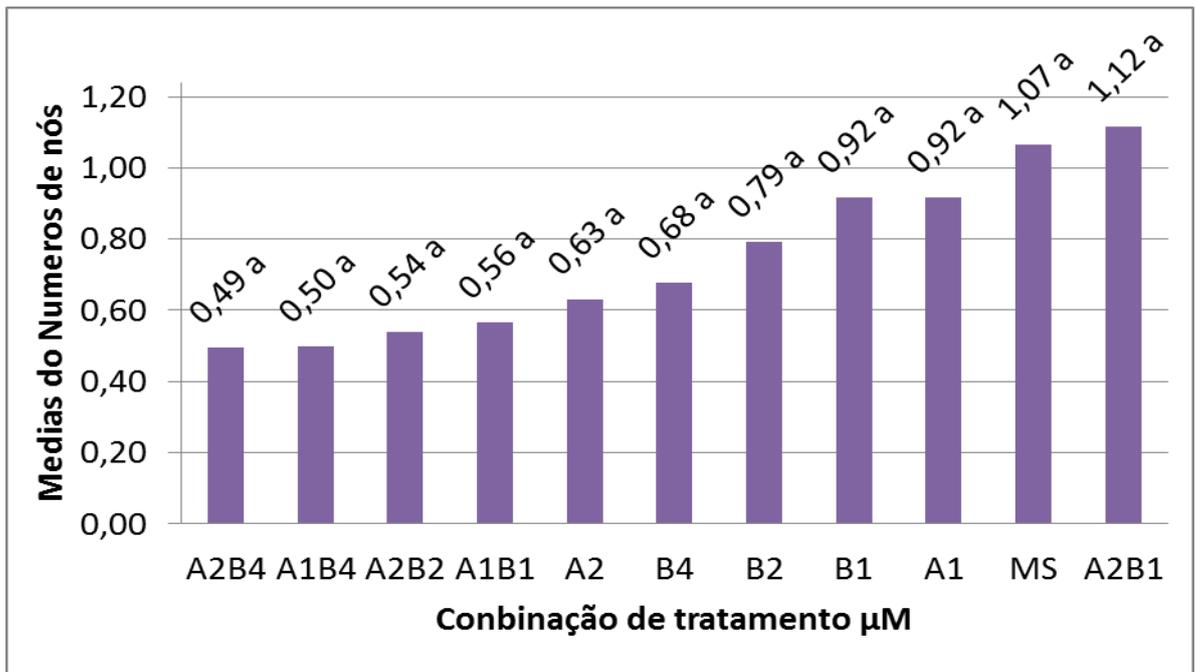


Figura 4. Número médio de brotos de *Rosmarinus officinalis* em resposta ao meio de cultura básico MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado ou não com os fitorreguladores ANA (0 e 0,1 µM) combinado com BAP (0; 0,5 e 1,0 µM), após quatro semanas de cultivo. Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas dentro de cada tratamento de cultivo, indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). CV(%) = 13,66 Para dados transformados em $(x + 0,5)^{0,5}$

Para o parâmetro números de nós por explantes, não houve diferença significativa entre médias dos tratamentos (Figura 4). Também para a média de altura (cm) dos brostos não apresentou diferença significativas para o estudo realizado,(Fig. 5). Em trabalhos de cultivo *in vitro* de *Ananas comosus*, a altura da parte aérea se torna uma variável importante, pois está diretamente relacionada com o número de nós que serão recuperados em novas brotações (MOREIRA, et al., 2003). A suplementação do meio de cultura com ANA e BAP ou BAP sozinho não promoveu diferenças estatísticas significativas para o alongamento *in vitro* *Aechmea Ramosa* e *Billbergia euphemiae* (FARIA et al. 2012). As medias das Altura não foram significativas, não tendo diferenças entre si. Moura *et al.* (2012) também contataram em *Plathyenia reticulata* as combinações de BAP e ANA utilizadas não foram eficientes no alongamento de gemas axilares.

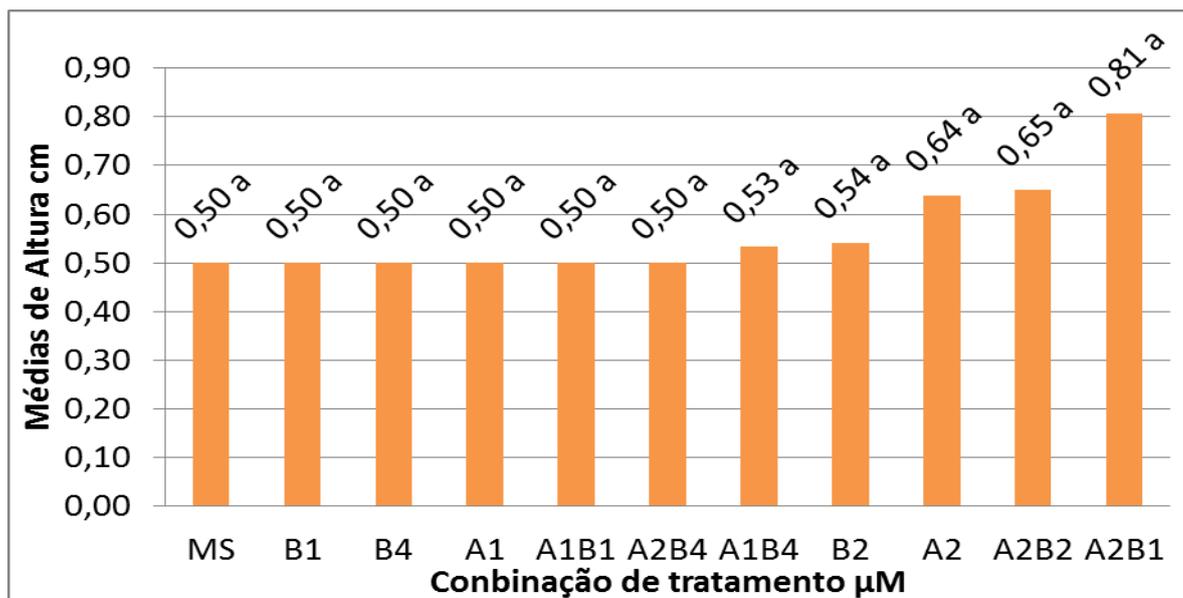


Figura 5. Número médio de brotos de *Rosmarinus officinalis* em resposta ao meio de cultura básico MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado ou não com os fitorreguladores ANA (0 e 0,1 μM) combinado com BAP (0; 0,5 e 1,0 μM), após quatro semanas de cultivo. Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas dentro de cada stratoamento de cultivo, indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). CV(%) = 5.97 Para dados transformados em $(x + 0,5)^{0,5}$

2.4. Conclusão

No processo de introdução *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* observou-se alta incidência de oxidação e contaminação dos explantes e estes eventos também foram observados durante os subcultivos. A permanência de contaminação durante os cultivos tem evidenciado a presença de bactérias endógenas.

Para as culturas isentas de contaminações e oxidação foi identificada a ocorrência de dois tipos de regeneração de brotos. Uma pela via de organogênese direta, pela ocorrência de regeneração de brotos diretamente dos explantes e outra pela via indireta, com a indução de calo seguida da regeneração de brotos.

Estes resultados implicam que é necessário estabelecer cultivos livres de contaminação, provavelmente, com o uso de antibióticos no meio de cultivo e, também, o uso de antioxidantes durante os subcultivos fazem-se necessário para reduzir os índices de oxidação e necrose das culturas.

Portanto, foi evidente no presente trabalho que a estratégia de multiplicação *in vitro* do Alecrim foi pela rota morfogênica da organogênese. No entanto, as ocorrências de contaminação e oxidação ao longo dos subcultivos revelaram os principais entraves para a micropropagação clonal em escala desta espécie.

Referências

- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; 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 SPI: Embrapa CNPH**. v.1, p. 87-132. 1998
- CARUSO, J. L.; CALLAHAN, J.; DECHANT, C.; JAYASIMHULU, K.; WINGET, G. D. Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of *Rosmarinus officinalis*. **Plant Cell Reports**. v. 19, p. 500-503. 2000
- CASTRO, H.C.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. Visconde do Rio Branco, MG: Editora Suprema. 2001.
- COMPTON, M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.37, p.217-242, 1994.
- COSTA, D.T.; DROSTE, A. Efeito da esterilização sobre o estabelecimento da cultura *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* Linn. (Lamiaceae). **PESQUISAS, BOTÂNICA**. São Leopoldo, V.61, p. 315-324, 2010.
- DALMAS, F. R. ; MARTINS, F. S. ; ASTARITA, L. V. . Multiplicação *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* (Linn.). In: VII Salão de Iniciação Científica PUCRS, 2006, Porto Alegre. **Anais do VII Salão de Iniciação Científica PUCRS**, 2006.
- DAL VESCO, L. L. ; JACOMEL JUNIOR, N. ; CAPRESTANO, C. A. ; HOLDERBAUM, D.F. ; GUERRA, M.P . Micropropagação de lavanda cultivar Lavandin (*Lavandula x intermedia Emeric ex Loiseleur*). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 716-720, 2007.
- DAL VESCO, L. L. ; PINTO, A. DE A ; ZAFFARI, G. R. ; NODARI, R.O. ; REIS, M. S. DOS ; GUERRA, M.P . Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. **Fruits (Paris. Imprimé)**, França, v. 56, n.3, p. 143-154, 2001.
- FARIA D.V., LIMA A.B.P., SIMÃO M.J., WERNER E.T., SOARES T.C.B.. Efeito de ANA e BAP no Alongamento *In Vitro* de *Aechmea Ramosa* Martius Ex Schultes F. E *Billbergia Euphemiae* E. Morren (Bromeliaceae). **Centro Científico Conhecer**. Goiânia, v.8, N.14; p. 466, 2012.
- GIACOMETTI, D. C. **Ervas condimentares e especiarias**. São Paulo: ed. Nobel, p. 158, 1989
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. IN: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. **Embrapa Spi/Embrapa-Cnph**. Brasília. v. 1, p. 183-260. 1998.
- GUERRA M.P.; NODARI R.O. Introdução ao conceito de Biotecnologia Apostila. De Biotecnologia.CCA/UFSC; **Edição Da Steinmacher**. Florianópolis, 2006.

JARDIM L.S, SAMPAIO P. T. B., COSTA S.S., GONÇALVES C.Q.B., BRANDÃO H.L.M. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Revista Acta Amozina** v. 40. pg. 275 – 280.2010:.

JUDD W.A.; CAMPBELL C.S.; KELOGG E.A.; STEVEN P.F. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. São Paulo. ed. Artmed. 2009.

KOMALI, A. S.; SHETTY, K.. Comparison of the growth pattern and rosmarinic acid production in rosemary (*Rosmarinus officinalis*) shoots and genetically transformed callus cultures. **Food Biotechnology**. v.12, p. 27-41. 1998

KRUPPA, C.P.; RUSSOMANNO O.M.R. Ocorrência de fungos em sementes de plantas medicinais aromáticas e condimentares da família Lamiaceae. **Tropical Plant Pathology**. v. 33, n. 1, p. 072-075. 2008.

LAINETTI R, BRITO N.R.S. **A cura pelas ervas e plantas medicinais brasileiras**. Rio de Janeiro. Editora Tecnoprint. 1979.

LIMA, G. P. P.; BARSALOBRES, C.; PIZA, I.M. T.; CEREDA, M. P. Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv MCOL 22) cultivada *in vitro*. **R. bras. Agrociência**, v. 8, n. 2, p. 107-110, mai-ago, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas Mediciniais no Brasil – Nativas e Exóticas. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda**. p. 223. 2002.

MÄDER, G. **Filogenia e Variabilidade Genética de *Calibrachoa heterophylla* (Sendtn.) Wijsman (Solanaceae)**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. **Princípios de Biotecnologia em Plantas: Uma Introdução a Engenharia Genética em Plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. p. 101-181. 1994

MISRA, P.; CHATURVEDI, H. C. Micropropagation of *Rosmarinus officinalis* L.. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** v. 3, p. 163-168. 1984

MOREL, G.M. & WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons **Am. J. Botany**, 38:138-140, 1951.

MOREIRA, M. A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, J. G.; FRÁGUAS, C. B. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1002-1006, 2003.

MOURA,L.C.; TITON, M.; MIRANDA, N.A.; MOREIRA, T.P.; OLIVEIRA, M.L.R. Multiplicação e alongamento *in vitro* de vinhático (*Plathymenia reticulata*). **Scientia Forestalis** Piracicaba, v. 40, n. 96, p. 499-505, dez. 2012

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v.15, p.473-497. 1962.

MURASHIGE, T.. Clonal crops through tissue culture. In: Tissue Culture and its bio-technological application. Barz, W.; Reinhard, D.E.; Zenk, M.H. (eds). Springer-Verlag. Berlin. p. 392-403. 1977

- NASCIMENTO, A. R. T.; LONGHI, S. J.; BRENA, D. A. Estrutura e padrões de distribuição espacial de espécies arbóreas em uma amostra de Floresta Ombrófila Mista em Nova Prata, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.11, n.1, p.105-119, 2001.
- PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **B. CEPPA.Curitiba**. v. 19, n. 2. p. 193-210, jul/dez. 2001.
- SEXTO P. A. S.; GRANDO M. F.; NIENOW A. A.; NOLLA D.; AUGUSTIN L.. Cultivo *In Vitro* De Ápices Caulinares De *Ginkgo Biloba In Vitro* Culture Soot-Tips Of *Ginkgo Biloba*. **RAMVI, Getúlio Vargas**, v. 01, n. 01, jan./ jul. 2014.
- SILVA, A.M.O.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; CARVALHO, E.B.T; LIMA, A.; NOVOA, A.V.; MANCINI-FILHO, J. Efeito do extrato aquoso de *alecrim* (*Rosmarinus officinalis L.*) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos. **Rev. Nutr.**, Campinas, 24(1):121-130, jan./fev., 2011
- SILVA, M.S.A.; SILVA, R.M.A.; HIGINO, J.S.; PEREIRA, M.S.V.; CARVALHO, A.A.T. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis Linn.* sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 18(2): 236-240, Abr./Jun. 2008.
- SIMPSON, M.G. **Plant Systematic**. Amsterdam: Elsevier. 2006
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em *APG II*. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**. p. 640. 2005
- STEHMANN, J. R. **Estudos taxonômicos na tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave & Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann & Semir**. 1999. 312 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 1999.
- STREET, H.E.. **Cell (Suspension) Cultures** - Techniques. In: Street, H.E. (ed.). *Plant Tissue and Cell Culture*. University of California Press. Berkeley and Los Angeles.. pp. 61-102. 1977.
- THORPE, T.A. 1980. **Organogenesis in vitro: structural, physiological, and biochemical aspects**. In: **Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture**. Academic Press. New York. Vasil, I.K. (ed.). pp. 71-111.
- TORRES, A.A.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRIGIDO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília:Embrapa Hortaliças, 2000.
- VENDRUSCULO, G.S. **Diversidade e distribuição de Solanaceae em formações vegetais altomontanas no sul do Brasil**. Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto Biociências, Departamento de Botânica, 163f., 2009.

3. CAPÍTULO 2 - MICROPROPAGAÇÃO DE *Calibrachoa sellowiana* (SENDTN.) WIJSMAN: ESPÉCIE NATIVA DOS CAMPOS SULINOS

3.1. Introdução

A família **Solanaceae** esta presente na Floresta Ombrófila Mista, e destacando-se como uma das maiores entre as angiospermas eudicotiledôneas, reunindo cerca de 150 gêneros e 3000 espécies, com distribuição cosmopolita, que esta amplamente dispersas na região neotropical (FELICIANO, 2008 apud SOUZA & LORENZI, 2005).

Os representantes na família Solanaceae são arbóreos, arbustivos, herbáceos, escandentes e epifíticos. Alguns gêneros são de ocorrências campestres, como *Petunia* e *Calibrachoa*, tais espécies em muitas situações estão presentes em campos com afloramento de rochas e solos com pedregosidade (STEHMANN, 1999).

No contexto produtivo as espécies que mais se destacam são: a batata (*Solanum tuberosum*), o tomate (*S. lycopersicum*), o tabaco (*Nicotiana tabacum*) e muitas possuem utilização ornamental como os gêneros *Petunia* e *Brunfelsia* (GIACOMINI, 2010). Segundo Vendrusculo (2009) a ocorrência de muitas espécies da família é em áreas antropizadas, que se diferenciam em espécies pioneiras ou colonizadoras de áreas abertas (clareiras e bordas de floresta) ou até mesmo em paisagens degradadas.

A dispersão zoocórica é a principal forma através da quiropterocória e ornitocória. Barth et al. (2008) define a família como euripolínica, onde a morfologia polínica auxilia na delimitação de gêneros e espécies. A síndrome de polinização predominante na família é a melitofilia, mas algumas espécies podem ser polinizadas por beija-flores e mariposas (VENDRUSCULO, 2009).

As espécies de *Calibrachoa* são arbustivas, subarbustivas ou herbáceas e, em geral, possuem menos de 70cm de altura. As espécies arbustivas e subarbustivas apresentam caule com base espessada e lignificada (STEHMANN, 1999). *Calibrachoa* La Llave & Lex. pertence à tribo Nicotianeae, subfamília Cestroideae, e a maioria das suas 24 espécies ocorre na região subtropical da América do Sul (STEHMANN, 1999).

Mäder (2008) relata que o gênero ocorre exclusivamente no sudeste da América do Sul, de Minas Gerais até o Uruguai, com abundância máxima nos estados brasileiros do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

O gênero *Calibrachoa* ocorre em regiões da América do Sul, compreendendo o estado de Minas Gerais até o Uruguai, com maior abundância nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do

Sul (MÄDER, 2008; STEHMANN, 1999). Ocorre na região dos campos de Palmas e Curitibaanos. Habita os afloramentos rochosos na região com domínio dos campos naturais do planalto, mas também podem ser encontradas em afloramentos rochosos em meio ao domínio florestal ou beira de estradas (STEHMANN, 1999).

Sugere-se que o gênero teria surgido a partir da radiação adaptativa dos Andes, conduzindo assim as espécies do gênero evoluíram divergentemente, colonizando áreas de clima subtropical como a região dos pampas e o planalto catarinense (MÄDER, 2008). As espécies do gênero *Calibrachoa* são arbustivas, subarbustivas ou herbáceas e, em geral, possuem menos de 70cm de altura. A maioria tem seu caule lenhoso, o que sugere que sejam perenes. Seu sistema radicular é composto de uma raiz axial espessada e algumas raízes desenvolvidas. Possui hábito decumbente, e estão presentes nos campos arenosos ou pedregosos e afloramentos e paredões rochosos (STEHMANN, 1999). O ciclo de vida é desconhecido e sua sobrevivência nos campos depende da rigorosidade do clima (estação fria). O indumento das espécies de *Calibrachoa* é pubérulo, tomentoso, piloso ou subviloso e constituído de tricomas simples e unisseriados. As espécies de *Calibrachoa* são hermafroditas, possuem flores homomórficas e o estigma abre-se entre as anteras, de forma que a autopolinização deve ser um fenômeno comum (STEHMANN, 1999)

A espécie *Calibrachoa sellowiana* pertence a família das *Solanaceae* gênero *Petunia*. Segundo Smith (1966) possui nome vulgar de Petunia, mas também é conhecida como *Petunia sellowiana*, *Fabiana sellowiana*, *Petunia alpícola* (SMITH, 1966).

Caracterizada como erva ou arbusto, prostrado, vestido de pelos curtos, rígidos, glandulíferos (SMITH, 1966). Subarbusto decumbente, raramente subereto, podendo atingir até 25(35)cm de altura (STEHMANN, 1999; SOARES, 2011).

Espécie heliófita e indiferente, quanto às condições físicas dos solos, é encontrada as mais variadas zonações, desde as úmidas até as secas. Trata-se muito frequente, sobretudo nos campos, beira dos rios, sobre rochas e orla das matas, podendo ser solo raso ou bem drenado com acúmulo expressivo de água ou apenas umidade (SOARES, 2011; GOMES, 2009).

Sua distribuição geográfica e habitat estão estabelecidos numa área de dispersão na região de Curitibaanos, Água Doce, Campos Novos, Lages, São Joaquim, Bom Retiro (SMITH, 1966; STEHMANN, 1999). Característica e exclusiva do planalto catarinense; trata-se, sem dúvida, de uma das espécies mais importantes do gênero em Santa Catarina (SMITH, 1966; SOARES, 2011).

Suas folhas são tidas como sésseis, lâmina oblanceolada, elíptica, ápice obtuso, às vezes agudo, base atenuada, simétrica ou levemente assimétrica, plana ou canaliculada, nervura primária evidente, impressa na face adaxial, saliente na abaxial, calosidade basal ausente (SMITH, 1966;

STEHMANN, 1999). Caule com base lenhosa, ramosa, glabrascente ou pubérula, com coloração marrom ou acinzentada, sulcada, ramos apicais víscido-pubéculos. (STEHMANN, 1999)

Além das gramíneas, especialmente no início do verão, também se destaca na fisionomia o colorido de flores e inflorescências de diferentes famílias, como espécies de *Senecio*, formando "margaridas" brancas, rosas ou amarelas, *Calibrachoa sellowiana* e diferentes espécies de Melastomataceae, com flores rosas ou violáceas, entre outras. Suas flores possuem coloração magentas, purpúreas, violáceas, brancas ou rosadas, geralmente com tubo amarelo no interior (SOARES, 2011; STEHMANN, 1999).

Sua estratégia floral é através da reflexão da luz solar através da coloração de suas flores, com intuito de atrair visitantes florais (STEHMANN, 1999). É uma espécie melitófila visitada por abelhas das famílias *Andrenidae*, *Anthophoridae*, *Colletidae* e *Halictidae* (STEHMANN, 1999). Há regiões onde mais de uma espécie de abelha é encontrada visitando e utilizando os recursos de flores de uma ou mais espécies de *Calibrachoa* (STEHMANN, 1999). O néctar é produzido em pequena quantidade e está disponível nas paredes dos ductos interestaminais (SMITH, 1966). Seu florescimento é de setembro a abril e sua frutificação de outubro a abril (STEHMANN, 1999).

O potencial de uso como ornamental no paisagismo é de fundamental importância conhecer a época e a duração da floração, a característica mais apreciada pelos consumidores, assim como a época de dispersão de sementes, necessária para uma futura produção comercial da espécie (MARTINI *et. al.*, 2010). O cultivo de *Petunia* sp., para utilização como ornamental, foi registrada em 1830, através de sucessivos cruzamentos interespecíficos (MADER, 2008). Todas as espécies do gênero *Calibrachoa* sp. Têm flores ornamentais, podendo ser exploradas para este fim (SOARES, 2011). Seu potencial ornamental pode ser explorado visando conservar o material, configurado de acordo com Stehmann (1999) que espécimes com distribuição geográfica mais setentrional (em latitudes menores) possuem valores maiores para o ambiente que se encontram.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi de identificar os processos para a micropropagação e avaliar os efeitos das concentrações e combinações de BAP E ANA no estabelecimento de protocolos para a micropropagação em escala de *Calibrachoa sellowiana*.

3.2. Material E Métodos

3.2.1. Material Vegetal e ambiente de cultivo

Plantas matrizes de *Calibrachoa sellowiana* previamente coletadas de exemplares existentes na área do Campus da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Curitibanos, região do Panalto Catarinense, foram transportadas e cultivadas em vasos e mantidas em casa de vegetação

sob condições de temperatura e umidade controladas, foram fonte de explantes para a introdução *in vitro*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia e Genética do Campus Curitibanos, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no período de novembro de 2013 a junho de 2014. O meio de cultura básico utilizado no cultivo *in vitro* foi composto pela formulação salina MSB (Murashige & Skoog, 1962), adicionados de vitaminas de Morel (MOREL & WETMORE, 1951), 30 g L⁻¹ de sacarose e com 7,5 g L⁻¹ de Agar-agar, aqui denominado de MSB. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C, a 1,3 atm., por 15 minutos. O processo de inoculação das culturas foi realizado em uma câmara de fluxo laminar. E as culturas foram mantidas em ambiente de câmara BOD com temperatura de 25 °C ± 2 °C, com fotoperíodo de 14 horas.

3.2.2. Indução e estabelecimento *in vitro*

Segmentos nodais e ápices caulinares excisados com 1,0 a 1,5 cm de comprimento, contendo duas gemas foram à fonte de explantes utilizados para a introdução *in vitro*. Após a excisão os explantes foram lavados em água corrente e com duas gotas do surfactante Tween-20 0,1% (v/v) por cinco minutos. Em câmara de fluxo laminar foram submetidos a um processo de desinfestação, sob agitação, através da imersão em álcool etílico 70% (v/v) por um minuto, com água sanitária a 40% (v/v) contendo 1% de cloro ativo por 15 minuto e em seguida três enxágües em água autoclavada. Para a indução de brotos, os segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio (18 x 150 cm), contendo 10 ml de meio de cultura com combinações de fitorreguladores.

O desenho experimental foi um bifatorial 2x3 com seis tratamentos, com a suplementação ao meio de cultura básico MSB com diferentes combinações de fitorreguladores: Duas concentrações de ácido naftalenoacético - ANA (0 e 0,1 µM) combinados com três concentrações de Benzilaminopurina - BAP (0; 0,5 e 1,0 µM). Cada unidade experimental foi constituída de cinco tubos de ensaio contendo dois explantes com duas gemas por explentes e repetidos três vezes. Após duas, três e quatro semanas de cultivo foram coletados dados de altura de brotos (cm), número de brotos e números de nós por explantes.

3.2.3. Regeneração e Multiplicação de Brotos

Brotações e culturas nodulares induzidas e estabelecidas *in vitro*, foram repicadas para promover a proliferação e a regeneração de brotações múltiplas, em dois diferentes meios de cultura básico MSB suplementado com a combinações dos fitorreguladores: 1) ANA (0,1 µM) e BAP (0,5 µM) e; 2) ANA (0,1 µM) e BAP (1,0 µM). Dados relevantes foram registrados com fotomicrografias com câmara Nikon®.

3.2.4. Alongamento dos brotos

Broto originadas do meio de cultura de regeneração foram repicadas para frascos tipo conserva de 340 ml contendo o meio de cultura MSB geleificado e isento de fitorreguladores. ...

3.2.5. Enraizamento ex vitro e aclimatização

Brotões com 3-5 cm de altura, contendo 4-5 segmentos nodais, originadas do meio de cultura básico MS e isento de fitorreguladores, foram preparadas para o processo de aclimatização pela segmentação e retiradas das folhas para evitar a desidratação. As micro estacas foram imersas em solução de Ácido Indolilbutírico – AIB a 50 ppm, por 15 minutos, para a indução de enraizamento. Em seguida foram transplantadas em bandeja de isopor com 128 células, com volume de 125 cm³ por célula, contendo substrato comercial MecPlant®, previamente umedecido. Para evitar a desidratação das micro estacas, durante o transplantes, foram efetuados regas com pulverizador manual.

Para o controle constantes da umidade relativa e do substrato foi montado um pequenos túnel com filme plástico agrícola transparente sobre a bandeja. Esta bandeja com as micro estacas foi disposta sobre bancada em cada de vegetação em condições de temperatura e umidade controlada. Após três semanas em ambiente de aclimatização as mudas foram repicadas para vasos nº 3, com volume de 3.000 cm³, contendo substrato comercial MecPlant® e mantidas sob regas constantes.

3.2.5. Análise Estatística

Os dados coletados de cada parâmetro foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste Student-Newman-Keuls (SNK-5%) de separação de médias, quando necessário os dados originais foram transformados em $(x+0,5)^{0,5}$ ou $\log(x+1)$, segundo as recomendações de Compton (1994).

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Indução e estabelecimento in vitro

A excisão de brotações jovens de plantas matrizes de *Calibrachoa sellowiana* mantidas em ambiente de casa de vegetação (Fig. 01A), permitiu com sucesso a desinfestação dos explantes e estabelecimento *in vitro* da espécie (Fig. 01B-H). A indução a proliferação de brotos *in vitro*

ocorreu em duas semanas após o isolamento das gemas em MSB suplementado ou não com fitorreguladores (Dados não mostrados).

No presente trabalho, o uso do meio de cultura MSB suplementado com a combinação de ANA (0,1 μM) com BAP (1,0 μM) e também em ANA (0,1 μM) com BAP (0,5 μM) promoveu a maior e significativa ($p > 0,01$) proliferação de brotos (20,9 brotos /explantes) em quatro semanas de cultivo (Figura 02 e Figura 1C e E). Este padrão de proliferação foi observado neste meio de cultura a partir de três semanas de cultivo (Figura 2). Alta taxa de proliferação de brotos de *Lavandula viridis* também foi obtida com o cultivo em meio MSB suplementado com BAP (0,67 μM), após quatro semanas em cultivo. Dal Vesco et al. (2007) também observaram um maior número médio de brotos em *Lavandula*, quando foi suplementado ao meio básico MS com BAP (1,0 μM). Em experimentos com *Ananas comosus* o uso concentrações elevadas de BAP e ANA no meio de cultura efetivou uma maior produção de brotos (MACEDO et al. 2003). Porém, Macedo et al. (2003) também conclui que os tratamentos de concentrações menores de BAP e ANA, são os mais indicados para serem utilizados ao meio de cultura, pois proporcionam a maior facilidade de separação dos brotos para etapas seguintes de propagação.

O meio MS contendo BAP combinado com qualquer uma das concentrações de ANA foi melhor para o número médio de brotos, diferindo estatisticamente entre si (Figura 4). No trabalho de micropropagação realizado por Souza et al. (2003) com *Lychnophora pinaster*, as melhores respostas para o número de gemas foram obtidas com adição de BAP ao meio, atestando a eficiência deste fitorregulador para a formação de gemas. Assim como Pasqual et al. (1991), que encontraram uma maior indução da multiplicação de brotos de amoreira preta com a adição de uma auxina sintética (ácido indolilbutírico).



Figura 01. Estratégia de cultivo *in vitro* de *Calibrachoa sellowiana* (Sendtn.) Wijsman. A) Planta matriz cultivada em vaso em casa de vegetação; B) Início da indução de brotos a partir de Culturas Nodulares (CNs), após 5 semanas de cultivo; C) Regeneração de brotos e CNs em ciclo repetitivo em meio de cultura MS suplementado com BAP (2 μM) após 7 semanas de cultivo; D) Indução de broto a partir de calo em meio de cultura MS suplementado com ANA (0,1 μM) + BAP (1 μM), após 9 semanas de cultivo; E-F) Desenvolvimento de brotos em meio de cultura MS + ANA (0,1 μM) + BAP (1 μM) quando os brotos foram induzidos em: E) MS isento de fitoreguladores e; F) MS + ANA (0,1 μM); G) Brotos alongados em meio de cultura MS isento de fitoreguladores; H) Brotos enraizados quando cultivados em frascos; I-J) Mudas aclimatizadas: I) após 3 semanas e; J) após 6 semanas. Barra: A; J= 5,0 cm; B-I = 1,0 cm.

O aumento do nível de BAP também induziu um maior número de brotos hiperhídricos de lavanda, enquanto que, a ausência de BAP no meio de cultura resultou em maior alongamento de brotos (DAL VESCO et al, 2007). Este procedimento pode ser indicado para o cultivo de brotos que serão destinados para a aclimatização.

Pereira e Fortes (2004) ressaltam que o uso de ANA, juntamente com os demais constituintes do meio, apresenta importante papel na diferenciação por promover o crescimento do tecido meristemático de *Solanum tuberosum*. Embora, para estes autores, a consistência do meio de isolamento tenha influenciado a formação de calo nos meristemas, era de se esperar posteriormente, em meio de multiplicação, um maior número de brotações regeneradas a partir dos calos formados, baseado na teoria da totipotência celular.

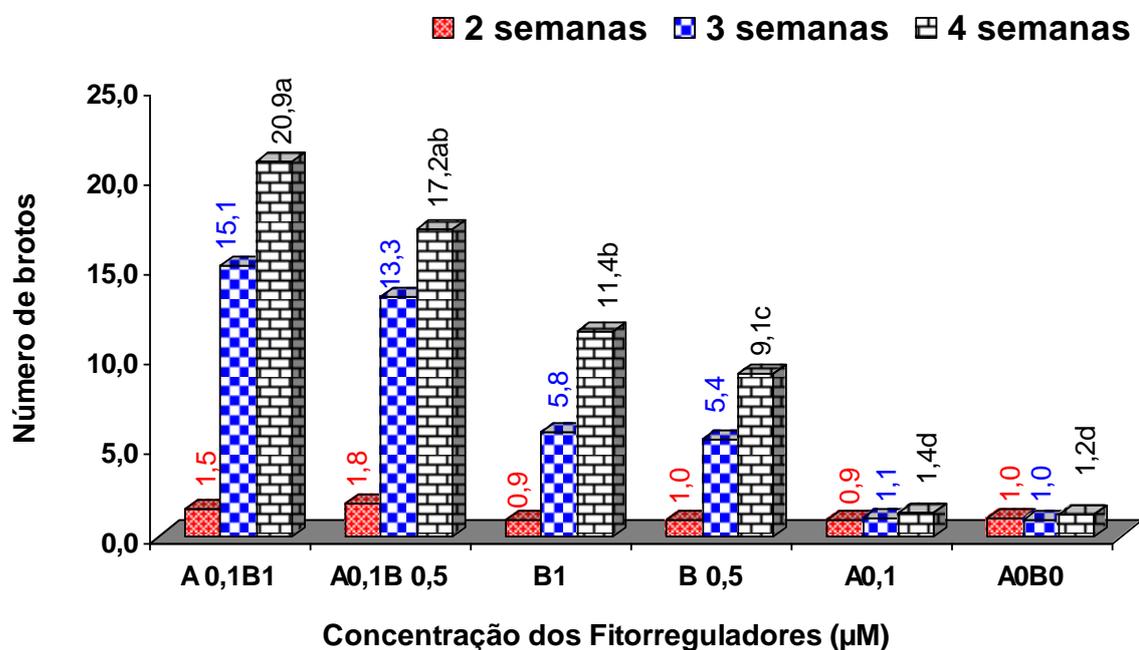


Figura 02. Número médio de brotos de *C. sellowiana* em resposta ao meio de cultura básico MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado ou não com os fitorreguladores ANA (0 e 0,1 µM) combinado com BAP (0; 0,5 e 1,0 µM). Após duas, três e quatro semanas de cultivo. *Média de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas dentro de cada semana de cultivo, indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). CV(%) = 30,67; Dados transformados em log (x+1).

3.3.2. Regeneração e multiplicação de brotos

Durante os subcultivos das culturas estabelecidas *in vitro*, observou também que, a suplementação ao MSB com ANA (0,1 µM) em combinação com BAP (1 µM resultou em média maior e significativo número médio de micro brotos por explantes (Figura 1E). Outro fator

importante observado nestas culturas foi à coloração verde-claro e texturas semelhantes a culturas nodulares (CN) a e observadas a partir de duas semanas de cultivo (Figura 1C). CNs de *Vriesea reitzii* obteve aglomerados de nódulos organogênicos friáveis indiferenciado, com coloração verde-amarelada a translúcido (DAL VESCO & GUERRA, 2010) Finalmente, aglomerados de nódulos meristemáticos foram obtidos a partir de explantes de licença de *S. birrea* em meio de cultura MS suplementado com ANA e BAP (MOYO et al., 2009).

A diferenciação para CN com coloração verde amarelada foi observada a partir das gemas axilares quando cultivadas na presença de TDZ, após cinco semanas de cultivo e a proliferação dos *clusters* de CN com a indução e regeneração múltipla de pequenos brotos adventícios foi observada após nove semanas de cultivo com *Billbergia zebrina* (DAL VESCO et al. 2011). No presente estudo a formação de calo mesmo não sendo uma variável analisada estatisticamente, deve ser mencionada, pois 55,56% das unidades amostrais apresentaram calogênese. Pereira e Fortes (2004) *Solanum tuberosum* observaram como principal aspecto ao final do período de diferenciação dos meristemas a forte formação de calosidade obtida quando os explantes foram cultivados em meio de isolamento.

Conceitualmente, para todas as plantas o calo é um tecido formado pela intensa e desordenada divisão das células do explante, geralmente em consequência de seu cultivo em meio com altas concentrações de auxina (MANTELL *et al.*, 1994).

Enquanto que, o número de nós as diferenças de medias Foram significativas entre as combinações e concentrações de ANA e BAP, após 4 semanas de cultivo(Figura 3). Em meio de cultura isento de fitorreguladores MSB também foi notada a formação de parte aérea, assim como para os demais tratamentos. As altas taxas de emissão de parte aérea em mandioca (*M. esculenta*) foram observadas por Nicolini (1995) em cultura de nós caulinares cultivadas em meios contendo baixas concentrações de ANA. Gratapaglia e Machado (1998) sugerem que concentrações excessivas de auxina no meio de cultura podem inibir a multiplicação ou favorecer demasiadamente o enraizamento ou a formação de calos em detrimento à multiplicação.

Porem, nesse estudo observou-se que a altura (cm) das brotações apresentaram diferenças significativas para suas respectivas médias. Para a altura das plantas as médias mais elevadas foram obtidas nos tratamentos contendo ANA (0,1 μ M) (Figura 01F e Figura 04) e em MSB sem a adição dos fitorreguladores (Figuras 01E, G e H). Enquanto que, o uso do MSB isento de fitorreguladores resultou em baixa taxa de proliferação de CN e promoveu o desenvolvimento de um broto por segmento nodal (Figura 1G). Diniz *et al* (2003) também observou maior crescimento em altura, de plantas de Macela (*Egletes viscosa*), na ausência de BAP, assim como, Erig *et al.* (2002) em

pesquisas com amoreira preta, o aumento nos níveis de BAP resultou na diminuição do comprimento médio das brotações. Segundo Torres *et al.* (1998) o uso de citocininas estimula maior produção de parte aérea através do aumento da massa fresca, número de gemas e folhas, porém o contrário é obtido com a utilização de concentrações mais elevadas, acima da ótima para a multiplicação da espécie em estudo.

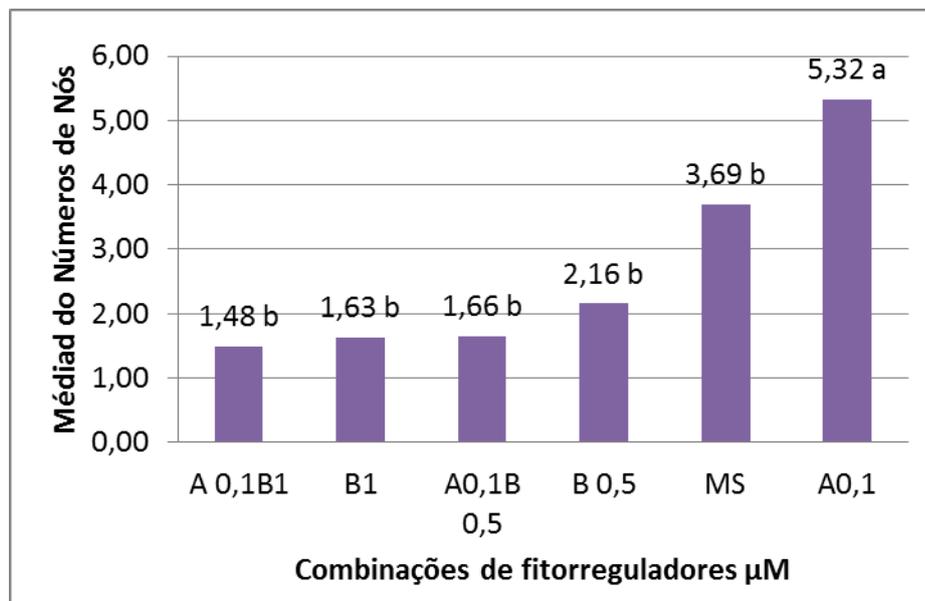


Figura 03. Número médio de nós por brotos de *C. sellowiana* em resposta ao meio de cultura básico MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado ou não com os fitorreguladores ANA (0 e 0,1 μM) combinado com BAP (0; 0,5 e 1,0 μM). Após quatro semanas de cultivo.

*Média de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas dentro de cada semana de cultivo, indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). CV(%) = 21,72 Dados transformados em $(x + 0,5)^{0,5}$

3.3.3. Enraizamento *ex vivo* e aclimatização

Brotos alongados e cultivados em tubos de ensaio (Figura 1G) ou em frascos do tipo conserva (Figura 1H) quando segmentados em micro estacas de 4-5 cm podem ser aclimatizados com sucesso (Figura 1I) quando mantidos em substratos comerciais, após três semanas da transferência para casa de vegetação com ambiente de temperatura e umidade relativa controlados. A repicagem das mudas para vasos, com o mesmo substrato obteve sucesso no desenvolvimento das mudas após seis semanas de cultivo em casa de vegetação (Figura 1J).

Segundo Guerra e Dal Vesco (2010) o principal fator que influencia o sucesso da aclimatização de plantas oriundas de micropropagação é o tamanho das plântulas. Desse modo foi realizado também o cálculo para o ganho médio do comprimento da parte aérea das plântulas

durante o cultivo (Fig. 01H). Em *Aechmea ramosa* (FARIA et al, 2012) também observou os maiores valores para o ganho médio da variável tamanho da parte aérea foram observados no meio MS (1,86 cm).

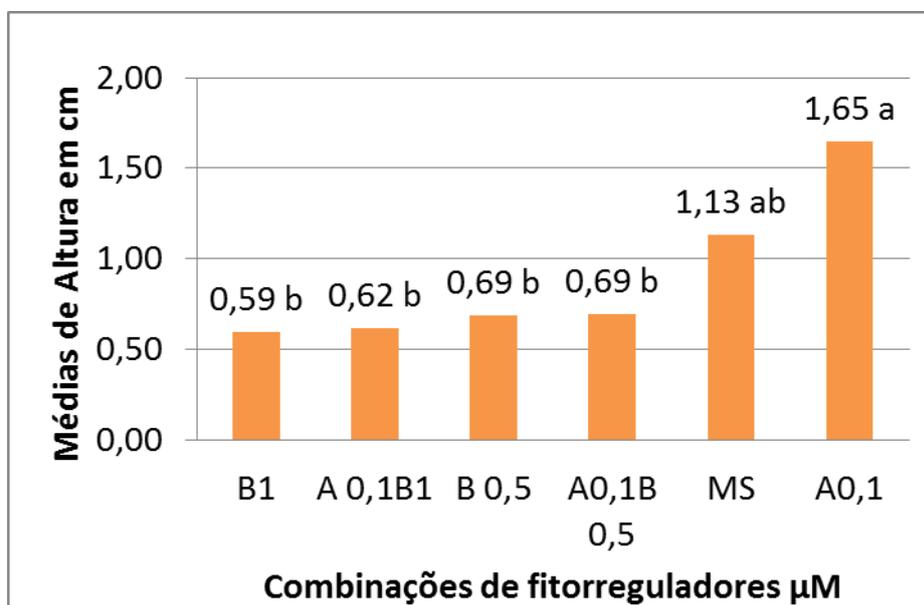


Figura 04. Altura média (cm) dos brotos de *C. sellowiana* em resposta ao meio de cultura básico MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado ou não com os fitorreguladores ANA (0 e 0,1 μM) combinado com BAP (0; 0,5 e 1,0 μM). Após quatro semanas de cultivo. *Média de três repetições. Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas dentro de cada semana de cultivo, indicam valores que diferem para o teste SNK (5%). CV(%) = 11,80; Dados transformados em $(x + 0,5)^{0,5}$.

3.4. Conclusão

A partir dos resultados observados neste trabalho podemos concluir que a propagação *in vitro* de *C. sellowiana* foi obtida com sucesso e também pode ser uma forma viável de promover a conservação deste importante recurso genético vegetal.

O uso do meio de cultura MSB suplementado com a combinação de ANA (0,1 μM) com BAP (1,0 μM) promove a alta produção de brotos e, também possibilitou o surgimento de culturas nodulares, que posteriormente se modificam em microbrotos e alongaram em brotos completos.

Uma das possíveis estratégias para a micropropagação da *C. sellowiana* se caracteriza pelo modelo da organogênese via formação de nódulos semelhantes às culturas nodulares.

Referências

- BARTH, O. M.; DUARTE, S. G. Morfologia polínica de espécies arbóreas de Solanaceae do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Hoehnea**. V.35. 379-386. 2008.
- COMPTON, M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.37, p.217-242, 1994.
- DAL VESCO, L. L. ; JACOMEL JUNIOR, N. ; CAPRESTANO, C. A. ; HOLDERBAUM, D.F. ; GUERRA, M.P . Micropropagação de lavanda cultivar Lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 716-720, 2007.
- DAL VESCO, L. L. ; GUERRA, M. P. . *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. **Scientia Horticulturae**, v. 125, p. 748-755, 2010.
- DAL VESCO, L. L. ; STEFENON, V.M. ; WELTER, L.J. ; SCHERER, R.F ; GUERRA, M.P . Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v.128, p. 515-522, 2011.
- DINIZ, J.D.N.; ALMEIDA, J.L.; TEIXEIRA, A.L.A; GOMES, E.S. E HERNANDES, F.F.F. Ácido giberélico (GA3) e 6- benzilaminopurina (BAP) no crescimento in vitro de Macela (*Egletes viscosa* (L.) Less.) **Ciência e agrotecnologia**, Lavras. V.27, n.4, p.934-938, jul./ago, 2003.
- ERIG, A.C.; GERSON, A.R.; FORTES, R.L. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira – preta (*rubus idaeus* l.), cv. tupy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.5, p.765-770, 2002
- FARIA D.V., LIMA A.B.P., SIMÃO M.J., WERNER E.T., SOARES T.C.B.. Efeito De Ana E Bap No Alongamento *In Vitro* De *Aechmea Ramosa* Martius Ex Schultes F. E *Billbergia Euphemiae* E. Morren (Bromeliaceae) **Centro Científico Conhecer**. Goiânia, v.8, N.14; p. 466, 2012.
- GIACOMIN, L. L. **Estudos taxonômicos e filogenéticos em *Solanum* sect. *Gonatotrichum* Bitter (Solanoideae, Solanaceae) no Brasil**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Botânica, 2010.
- GOMES, M. A.. **Caracterização da vegetação de Campos de Altitude em unidades de paisagem na região do Campo dos Padres, Bom Retiro / Urubici, SC**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. 2009.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. IN: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. **Embrapa Spi/Embrapa-Cnph**. Brasília. v. 1, p. 183-260. 1998.
- GUERRA, M.P.; VESCO, L.L. D. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.). (Org.). Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biolog. 1ed. New York: **Humana Press-Springer**, v. 589, p. 47-66, 2010.
- MACÊDO, C.E.C.; SILVA, M.G.; NÓBREGA, F.S.; MARTINS, C.P.; BARROSO, P.A.V.; ALLOUFA, M.A.I. Concentrações De Ana E Bap Na Micropropagação De Abacaxizeiro L. Merrill

(*Ananas Comosus*) E No Cultivo Hidropônico Das Plântulas Obtidas *In Vitro* . **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 3, p. 501-504, dez. 2003.

MÄDER, G. **Filogenia e Variabilidade Genética de *Calibrachoa heterophylla* (Sendtn.) Wijsman (Solanaceae)**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. **Princípios de Biotecnologia em Plantas: Uma Introdução a Engenharia Genética em Plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. p. 101-181. 1994.

MARTINI, A.; BIONDI, D.; BATISTA, A. C.; NATAL, C. M. Fenologia de espécies nativas com potencial paisagístico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 75-84, jan./mar. 2010.

MOREL, G.M. & WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons **Am. J. Botany**, V.38:138-140, 1951.

MOYO, M., FINNIE, J.F. VAN STADEN, J. *In vitro* morphogenesis of organogenic nodules derived from *Sclerocarya birrea* subsp. *caffra* leaf explants. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, v.98, p.273-280, 2009.

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

NICOLINI, E. S. **Morfogênese *in vitro* de cultivares de cassava (*Manihot esculenta* Crantz)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 87p. 1995.

PASQUAL, M.; PEIXOTO, P. H. P.; SANTOS, J. C. Propagação *in vitro* da amora-preta (*Rubus* sp) cv. Ébano: Uso de reguladores de crescimento. **Ciência e Prática**, Lavras, v.3, p.282- 286, 1991.

PEREIRA, Jonny Everson Scherwinski and FORTES, Gerson Renan de Luces. Organogênese de ápices meristemáticos de batata em meios de isolamento e multiplicação *in vitro*. **Hortic. Brasileira**. 2004, vol.22, n.2, pp. 197-201.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J.; KLEIN, R. M. **As plantas: Solanáceas**. Itajaí: Herbário "Barbosa Rodrigues", 1966. 321 p.

SOARES, E. L. de C.; VIGNOLI-SILVA, M.; MENTZ, L.A. Sinopse taxonômica e chave ilustrada dos gêneros de Solanaceae ocorrentes no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v.25: 346-362. 2011.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. p. 640. 2005

SOUZA, A.V. de; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORRÊA, R. M.; CASTRO, E. M. de. **Germinação de Embriões e Multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart**. Ciência e agrotecnologia, Lavras. Edição Especial, p.1532-1538, dez., 2003

STEHMANN, J. R. **Estudos taxonômicos na tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave & Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann & Semir.** 1999. 312 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 1999.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Volume I. Embrapa/Brasília.509p. 1998.

VENDRUSCULO, G.S. **Diversidade e distribuição de Solanaceae em formações vegetais altomontanas no sul do Brasil.** Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto Biociências, Departamento de Botânica, 163f., 2009.