

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

“Micropropagação da Figueira (*Ficus carica* L.):
Estabelecimento, Multiplicação e Enraizamento *in vitro*”

EDNAMAR GABRIELA PALÚ

Engenheira Agrônoma MSc.

Orientador: Prof. Dr. Luiz de Souza Corrêa

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia -
UNESP – Campus de Ilha Solteira, para
obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Especialidade: Sistemas de Produção

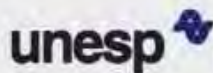
Ilha Solteira – SP

Fevereiro/2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da UNESP - Ilha Solteira.

P153m	<p>Palú, Ednamar Gabriela. Micropropagação da figueira (<i>Ficus carica</i> L.) : estabelecimento, Multiplicação e enraizamento <i>in vitro</i> / Ednamar Gabriela Palú. -- Ilha Solteira : [s.n.], 2011. 102 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de produção, 2011</p> <p>Orientador: Luiz de Souza Corrêa Inclui bibliografia</p> <p>1. Figo. 2. Gema apical. 3. Protocolo. 4. Tecidos (Anatomia e fisiologia) – Cultura e meios de cultura.</p>
-------	---



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Micropropagação da Figueira: Estabelecimento, Multiplicação e Enraizamento in vitro

AUTORA: EDNAMAR GABRIELA PALÚ

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ DE SOUZA CORREA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA ,
Área: SISTEMAS DE PRODUÇÃO, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LUIZ DE SOUZA CORREA

Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Profa. Dra. KUNIKO IWAMOTO HAGA

Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Profa. Dra. HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO

Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. FABIANO GUIMARÃES-SILVA

Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação / Instituto Federal Goiano

Profa. Dra. FLÁVIA DIONÍSIO PEREIRA

Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais Cerrados / Instituto Federal Goiano

Data da realização: 21 de fevereiro de 2011.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original”

Albert Einstein

Aos meus pais,

Marisa Aparecida Palú e Celso Palú

Fontes inesgotáveis de sabedoria, dedicação e amor...

A meu filho,

Arthur Palú de Souza

Motivação da minha vida...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por tudo, inclusive pelas dificuldades, pois só através delas conseguimos evoluir;
- A minha família, meus pais e meu filho pela dedicação e amor;
- A Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, pela oportunidade da realização do doutorado;
- A Universidade do Estado do Mato Grosso, pela minha liberação para cursar o doutorado;
- Ao meu estimado orientador, Prof. Dr. Luiz de Souza Corrêa pela oportunidade, confiança e, sobretudo pela paciência;
- Aos funcionários Valdecir e em especial José Hernandes, sempre me socorrendo nas horas de apuro;
- A aluna de graduação Aline Suzuki, que de estagiária passou a ser uma grande amiga, obrigada por toda a ajuda na condução dos meus trabalhos e acima de tudo pela amizade;
- Aos novos colegas que fiz Gabriel, Erica Moreira, Gustavo Alves Pereira e Danilo Aires pelas ajudas, horas de conversa e distrações;
- A Eliana Duarte Cardoso e seu noivo Flávio, os quais jamais terei como retribuir pela amizade e conselhos;
- A todos aqueles, que de uma forma ou de outra, estiveram presentes nessa fase da minha vida...

MICROPROPAGAÇÃO DA FIGUEIRA: ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO *IN VITRO*

Autora: Ednamar Gabriela Palú

Orientador: Luiz de Souza Corrêa

Resumo

A figueira (*Ficus carica* L.), pertencente à família Moracea, é uma frutífera de grande expansão mundial, constitui-se numa das mais importantes frutíferas cultivadas, elevando o Brasil à condição de décimo produtor e exportador de figos do mundo. Porém, a ficicultura tem alguns problemas fitossanitários como insetos pragas e doenças como nematóides e viroses, patógenos esses que se encontram presentes em grande parte dos plantios comerciais e, juntamente com a propagação exclusivamente vegetativa, pelo método da estaquia, contribuem para disseminação dos mesmos, reduzindo a qualidade final das mudas, as quais contribuem de modo marcante para a redução da produção por área, bem como da área plantada. A utilização de mudas de alta qualidade é um dos requisitos mais importantes para implantação de pomares com maior longevidade e elevada produtividade. Assim, a propagação *in vitro* pode auxiliar na produção eficiente de mudas de figueira com alta qualidade fitossanitária e genética. Entretanto, para a cultura da figueira, são escassos os trabalhos realizados *in vitro*, conhecendo-se pouco sobre o comportamento da planta, e principalmente como é realizado o estabelecimento desta, de forma que a maioria dos trabalhos já realizados por outros autores utilizam plantas já estabelecidas *in vitro*, tornando-se necessários outros ensaios, buscando a otimização de um protocolo para micropropagação da figueira. Objetivou-se com este trabalho estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* por meio de gemas apicais, envolvendo as etapas de desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.).

Palavras chave: *Ficus carica* L. Gema apical. Protocolo. Cultura de tecidos.

**MICROPROPAGATION THE FIG:
ESTABLISHMENT, MULTIPLICATION AND ROOTING *IN VITRO***

Abstract

The fig (*Ficus carica* L.) belonging to the Moraceae family, is a fruit of great global expansion, it constitutes one of the most important fruit crops, bringing Brazil to the position of the tenth largest producer and exporter of figs in the world. However, ficicultura presents some problems as plant diseases and insect pests as nematodes and viruses, these pathogens that are present in most commercial crops, and together with exclusively vegetative propagation by the method of cutting, contributing to the spread of these, reducing the final quality of seedlings, which contribute markedly to the reduction of production per hectare and area planted. The use of high quality seedlings is one of the most important requirements for implementation of orchards with greater longevity and high productivity. Thus, *in vitro* propagation can assist in efficient production of fig seedlings with high quality and plant genetics. However, for the cultivation of the fig tree, there are few studies performed *in vitro*, knowing little about the plant behavior, and especially how this is done setting so that most of the work already done by other authors using already established plants *in vitro*, making it required further testing, trying to optimize a protocol for micropropagation of fig. This study aimed to establish a protocol for *in vitro* propagation through apical buds, involving the steps of disinfection, *in vitro* multiplication and rooting of fig (*Ficus carica* L.).

Key words: *Ficus carica* L. Apical bud. Protocol. Tissue culture.

LISTA DE FIGURAS

3. Desinfestação de gemas apicais de figueira utilizando hipoclorito de sódio (NaClO) e cloreto de mercúrio (HgCl₂)

Figura 01. Gema apical de figueira (*Ficus carica* L.) *in vitro* contaminada pela bactéria *Serratia* spp. Ilha Solteira – SP, 2009..... 34

Figura 02. Gema apical de figueira (*Ficus carica* L.) *in vitro* contaminada por fungos. Ilha Solteira – SP, 2009. 36

Figura 03. Gema apical de figueira (*Ficus carica* L.) *in vitro* sadia e em crescimento (sobrevivente). Ilha Solteira – SP, 2009 37

Figura 04. Percentagem de contaminação bacteriana e fúngica, no controle com HgCl₂ (cloreto de mercúrio) para o estabelecimento *in vitro* de gemas apicais de figueira (*Ficus carica* L.) cv. ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante. Ilha Solteira – SP, 2009. 39

Figura 05. Percentagem de explantes sobreviventes, no controle com HgCl₂ (cloreto de mercúrio) para o estabelecimento *in vitro* de gemas apicais de figueira (*Ficus carica* L.) cv. ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante. Ilha Solteira – SP, 2009. 40

4. Desinfestação de gemas apicais de figueira utilizando diferentes antibióticos

Figura 06. Percentagens médias de contaminação bacteriana, no controle com antibiótico ampicilina sódica, para o estabelecimento *in vitro* de gemas apicais de figueira (*Ficus carica* L.) cv. ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante. Ilha Solteira – SP, 2009 51

Figura 07. Percentagens médias de explantes sobreviventes, no controle com antibiótico ampicilina sódica para o estabelecimento *in vitro* de gemas apicais de figueira (*Ficus carica* L.) cv. ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante. Ilha Solteira – SP, 2009. 52

7. Multiplicação e alongamento *in vitro* de figueira

Figura 08. Número médio de brotações de figueira (*Ficus carica* L.) cv ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante, cultivadas em meio de cultura com diferentes concentrações de BAP. Ilha Solteira – SP, 2009. 73

Figura 09. Comprimento médio das brotações em explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante, cultivadas em meio de cultura com diferentes concentrações de BAP. Ilha Solteira – SP, 2009..... 74

Figura 10. Brotações de figueira (*Ficus carica* L.) cv ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante com adição de 2 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultura. Ilha Solteira – SP, 2009 74

Figura 11. Comprimento médio de brotações de figueira (*Ficus carica* L.) cv ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante, cultivadas em meio de cultura com diferentes concentrações de GA₃. Ilha Solteira – SP, 2009 75

8. Efeito do floriglucinol sobre o enraizamento *in vitro* de figueira

Figura12. Brotação de figueira (*Ficus carica*L) cv ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante enraizada *in vitro* com adição de floriglucinol ao meio de cultura. Ilha Solteira – SP, 2009..... 82

LISTA DE TABELAS

3. Desinfestação de gemas apicais de figueira utilizando hipoclorito de sódio (NaClO) e cloreto de mercúrio (HgCl₂)

- Tabela 01. Quadrados médios das análises de variância e níveis de significância referentes à percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante contaminados por bactérias, fungos, oxidados e sobreviventes. Ilha Solteira – SP, 2009. 34
- Tabela 02. Percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante contaminados por bactérias, submetidas a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempos de imersão. Ilha Solteira – SP, 2009. 35
- Tabela 03. Percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante contaminados por fungos em diferentes tempos de imersão. Ilha Solteira – SP, 2009. 36
- Tabela 04. Percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante oxidados, submetidos a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempos de imersão. Ilha Solteira – SP, 2009. 37
- Tabela 05. Percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante sobreviventes, submetidos a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempos de imersão. Ilha Solteira – SP, 2009 38
- Tabela 06. Quadrados médios das análises de variância e níveis de significância referentes à percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante contaminados por bactérias, fungos e sobreviventes. Ilha Solteira – SP, 2009. 38

4. Desinfestação de gemas apicais de figueira utilizando diferentes antibióticos

- Tabela 07. Quadrados médios das análises de variância e níveis de significância referentes à percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante contaminados por bactérias, oxidados e sobreviventes. Ilha Solteira – SP, 2009. 48
- Tabela 08. Percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante contaminados por bactérias, oxidados e sobreviventes, submetidos a diferentes antibióticos adicionados ao meio de cultura. Ilha Solteira – SP, 2009. 48
- Tabela 09. Quadrados médios das análises de variância e níveis de significância referentes à percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante contaminados com bactéria e sobreviventes. Ilha Solteira - SP, 2009. 50

5. Contaminação bacteriana em gemas apicais de diferentes variedades de figueira

Tabela 10. Quadrados médios das análises de variância e níveis de significância referentes à percentagem de explantes de diferentes variedades de figueira (*Ficus carica* L.) contaminados por bactérias, oxidados e sobreviventes. Ilha Solteira – SP, 2009...58

Tabela 11. Percentagem de explantes de diferentes variedades de figueira (*Ficus carica* L.) contaminados por bactérias, oxidados e sobreviventes. Ilha Solteira – SP, 2009...58

6. Influência de diferentes meios nutritivos no estabelecimento *in vitro* de figueira

Tabela 12. Composição dos meios nutritivos MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), ½ MS, ½ WPM e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981)*.....64

Tabela 13. Quadrados médios das análises de variância e níveis de significância referentes à percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante crescidos *in vitro*. Ilha Solteira – SP, 2009.655

Tabela 14. Percentagem média de gemas apicais de figueira (*Ficus carica* L.) cv. ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante crescidas após a incubação em diferentes meios de cultura. Ilha Solteira – SP, 2009.....66

7. Multiplicação e alongamento *in vitro* de figueira

Tabela 15. Valores médios para o número médio de brotações de figueira (*Ficus carica* L.) cv ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante, cultivadas em meio de cultura com diferentes concentrações de GA₃. Ilha Solteira – SP, 2009 76

8. Efeito do floroglucinol sobre o enraizamento *in vitro* de figueira

Tabela 16. Quadrado médio da análise de variância e nível de significância referente à percentagem enraizamento *in vitro* em microestacas de figueira (*Ficus carica* L.) cv ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante. Ilha Solteira - SP, 2009..... 81

Tabela 17. Quadrados médios da análise de variância e níveis de significância referente à número de raízes e comprimento de raízes (cm) em microestacas de figueira (*Ficus carica* L.) cv ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante. Ilha Solteira - SP, 2009.....81

Tabela 18. Percentagem de enraizamento em microestacas de figueira (*Ficus carica* L.) cv ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante, tratadas com diferentes concentrações de floroglucinol após 10, 20, 30 e 40 dias de inoculação *in vitro*. Ilha Solteira – SP, 2009. 82

Tabela 19. Número e comprimento de raízes de microestacas figueira (*Ficus carica* L.) cv ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante *in vitro*, após 30 dias de inoculação, tratadas com floroglucinol. Ilha Solteira – SP, 2009.....83

SUMÁRIO

1 Introdução	13
2 Revisão de Literatura	14
2.1 Aspectos gerais da figueira.....	14
2.2 Caracterização botânica.....	16
2.3 Cultura de tecidos vegetais	17
2.3.1 Aspectos gerais	17
2.3.2 Estabelecimento do cultivo.....	18
2.3.3 Multiplicação das brotações	24
2.3.4 Enraizamento <i>in vitro</i>	25
2.4 Micropropagação da figueira.....	26
3. Desinfestação em gemas apicais de figueira utilizando hipoclorito de sódio (NaClO) e cloreto de mercúrio (HgCl₂)	28
3.1 Introdução.....	30
3.2 Material e Métodos	Erro! Indicador não definido.
3.3 Resultados e Discussão.....	33
3.4 Conclusões.....	41
4 Desinfestação em gemas apicais de figueira utilizando diferentes antibióticos	42
4.1 Introdução.....	44
4.2 Material e Métodos	45
4.3 Resultados e Discussão.....	47
4.4 Conclusões.....	52
5 Contaminação bacteriana em gemas apicais de diferentes variedades de figueira	53
5.1 Introdução.....	55
5.2 Material e Métodos	56
5.3 Resultados e Discussão.....	57
5.4 Conclusões.....	59
6 Influência de diferentes meios nutritivos no estabelecimento <i>in vitro</i> de figueira	60
6.1 Introdução.....	62
6.2 Material e Métodos	63
6.3 Resultados e Discussão.....	65
6.4 Conclusões.....	67
7 Multiplicação e alongamento <i>in vitro</i> de figueira	68
7.1 Introdução.....	70

7.2 Material e Métodos	71
7.3 Resultados e Discussão.....	76
7.4. Conclusões.....	76
8 Efeito do floroglucinol sobre o enraizamento <i>in vitro</i> de figueira	77
8.1 Introdução.....	79
8.2 Material e Métodos	80
8.3 Resultados e Discussão.....	81
8.4 Conclusões.....	84
9 Referências	85

1 Introdução

A figueira (*Ficus carica* L.), pertencente à família Moraceae, originária do Oriente Médio, é uma frutífera de grande expansão mundial, devido a excelente adaptação a diferentes climas, sendo cultivada tanto em regiões de clima temperado, como em regiões de clima subtropical quente. No Brasil é cultivada principalmente nas regiões Sul e Sudeste, devido às condições climáticas de invernos suaves e verões quentes ou relativamente suaves e úmidos (CHALFUN et al., 1997).

O Brasil é considerado o maior produtor de figos do Hemisfério Sul, numa área cultivada de aproximadamente 3.150 ha. O país detém a décima maior produção mundial (26.600 t), o que aloca o Brasil como um dos maiores produtores e o principal exportador de figos frescos para o mercado egípcio, turco e libanês, maiores consumidores mundiais do fruto (FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION – FAO, 2010). A expansão foi estimulada não só pela utilização do fruto *in natura*, mas também pela atrativa cotação do figo na indústria, a facilidade de cultivo e a precocidade da produção (FEITOSA et al., 2009).

No entanto, alguns problemas podem interferir na expansão da ficicultura nacional, pois, mesmo sendo muito apreciada pelos produtores, principalmente pela sua rusticidade, elevado vigor e produtividade, tem sérios problemas fitossanitários, que afetam e limitam o desenvolvimento da cultura no Brasil como alguns insetos pragas e doenças, das quais destaca-se: nematóides especialmente causador de galhas (*Meloidogyne incognita*), virose do nanismo, a seca da figueira (*Ceratocystes fimbriata*) e a mosca do figo (*Zaprionus indianus*) (RODRIGUES et al., 2009). Tais patógenos estão presentes em grande parte dos plantios comerciais e, juntamente com a propagação exclusivamente vegetativa, pelo método da estaquia, contribuem para disseminação dos mesmos, reduzindo a qualidade final das mudas, as quais contribuem de modo marcante para a redução da produção por área, bem como da área plantada (FERREIRA, 2006).

A utilização de mudas de alta qualidade é um dos requisitos mais importantes para implantação de pomares com maior longevidade e elevada produtividade. Para que essas mudas sejam produzidas dentro de padrões de qualidade exigidos por leis e possuam preços competitivos, é muito importante a otimização do sistema propagativo, aumentando a quantidade, qualidade e a velocidade de crescimento e desenvolvimento das mudas no viveiro, reduzindo o custo unitário das mudas (BRUM et al., 2002). Sob esse aspecto a propagação *in vitro* pode auxiliar na produção eficiente de mudas de figueira com alta qualidade fitossanitária e genética.

A cultura de tecidos vegetais consiste no cultivo de órgãos, tecidos ou células vegetais em meio nutritivo apropriado e ambiente asséptico. É uma técnica que oferece excelentes oportunidades para a propagação comercial de plantas, e também auxilia em programas de melhoramento, possibilitando neste caso, grande economia de tempo. Como técnica de clonagem comercial possibilita a obtenção de grande número de plantas a partir de poucas matrizes, em curto espaço de tempo, e em reduzida área de laboratório (PAIVA, 1998).

Entretanto, para a cultura da figueira, são escassos os trabalhos realizados *in vitro*, conhecendo-se pouco sobre o comportamento da planta, e principalmente como é realizado o estabelecimento desta. Autores como Guerra e Costa (1987) e Barbosa et al. (1992) relatam que a planta é estabelecida *in vitro* através da incubação de meristemas ao meio de cultura, mas nenhum dos autores cita a percentagem de explantes sobreviventes após a incubação. Brum (2001) e Fráguas (2003) descrevem sobre a micropropagação da figueira, mas os trabalhos realizados utilizam plantas já estabelecidas *in vitro*, tornando-se necessários outros ensaios, buscando a otimização de um protocolo eficiente para o estabelecimento *in vitro* da espécie.

Objetivou-se com este trabalho estabelecer um protocolo de micropropagação através de gemas apicais, provenientes de plantas cultivadas a campo, envolvendo as etapas de desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L).

2 Revisão de Literatura

2.1 Aspectos gerais da figueira

As figueiras estão entre as primeiras plantas cultivadas no mundo, tem origem na Ásia Ocidental e foi distribuída pelo homem em toda área do Mediterrâneo na antiguidade, incluindo os povos egípcios, judeus, gregos e romanos.

As figueiras ocorrem em todos os continentes, com exceção da Antártica. A figueira do figo comestível (*Ficus carica* L.) é a primeira planta descrita na Bíblia, quando Adão se veste com suas folhas, ao notar que está nu (Gênesis 3,7). O figo comestível tinha a vantagem de poder ser secado e se manter adequado a alimentação durante meses. Para atravessar o deserto, os povos antigos do Oriente Médio e norte da África utilizavam frutas secas, entre elas o figo, ricas em nutrientes e fáceis de conservar (SANTOS; RAMALHO, 1997).

O figo é considerado um fruto sagrado para os judeus. Ele faz parte dos sete alimentos que crescem na Terra Prometida, segundo a Torá (Deut. 8), o Antigo Testamento dos cristãos. Para os maometanos, o figo também é sagrado, pois Maomé jurou por ele e pela oliva, na sura 95 do Corão, designada por "O Figo". Para os budistas a figueira *Ficus religiosa* é venerada pois, debaixo de uma delas, Buda alcançou a sua revelação religiosa. Os maias e os astecas utilizavam a casca de figueiras nativas da região para produzir o papel utilizado nos seus livros sagrados. A descoberta por arqueólogos israelenses de que o figo já era cultivado na Cisjordânia há 11.400 anos, segundo a revista História Viva, nº 41, p. 17 - "Prato de resistência", demonstra que desde o neolítico o figo é ingrediente importante no farnel de muitas civilizações, especialmente o figo seco, pois era conservado e armazenado para consumo em épocas adversas como o inverno. No Egito antigo o figo era o alimento usado para a engorda do ganso para a produção do foie gras (o fígado de ganso gordo) o que, provavelmente, deu origem ao nome da iguaria (foie, figo; gras, gordo). Ainda no Egito, ele era também utilizado no preparo de pães artísticos, acrescentados à massa. Na Roma antiga, a técnica de engorda do ganso foi introduzida por Marcus Gavius Apicius (gastrónomo romano do séc. I d.C.). Ao lado do queijo e da cevada, o figo tinha um papel de destaque na Grécia antiga, principalmente em Esparta (CARAUTA; DIAZ, 2002).

Hoje a figueira se encontra aclimatada no Brasil, onde foi introduzida no século XVI, trazida na bagagem dos primeiros colonizadores portugueses, mas somente no século passado, com a introdução de grande número de variedades, a cultura começou a se expandir (LEONEL; DAMATTO JÚNIOR, 2007).

O figo pode ser consumido *in natura* ou industrializado. Os frutos das figueiras devem ser colhidos em diferentes estágios de maturação de acordo com sua destinação futura, no qual os frutos verdes se destinam basicamente a industrialização de doces e compotas; os inchados são usados para a produção do figo-rami, espécie de passa de figo; e os maduros são destinados à produção de doces em pasta (figada) ou para consumo *in natura* (CHITARRA; CARVALHO, 1985).

Outras formas de aproveitamento da cultura são as folhas na fabricação de bebidas fermentadas, ramos como propágulos e a extração da ficcina, enzima proteolítica com propriedade hidrolisante de proteína (ALVARENGA et al., 2007).

A colheita e pós-colheita devem ser realizadas com extremo cuidado, evitando-se danos físicos aos frutos. Os frutos são retirados manualmente das árvores, um a um, com todo o pedúnculo e colocados em caixas de colheitas forradas (palha, espuma ou outro material). O

látex ou “leite” produzido pela planta é irritante, devendo a colheita ser realizada com proteção das mãos (ABRAHÃO et al., 1997).

2.2 Caracterização botânica

A figueira pertence à família Moracea, o gênero *Ficus* compreende cerca de 1000 espécies, algumas das quais produtoras de frutos comestíveis e, é dividido em 48 subgêneros com base em características que diferenciam os grupamentos de espécies. A espécie *Ficus carica* L. pertence ao subgênero Eusyce, é a única cultivada comercialmente no Brasil, pode desenvolver-se formando árvores de porte médio a grande. Porém, devido às técnicas de manejo empregadas na cultura, essas plantas não ultrapassam o porte arbustivo (PEREIRA; NACHTIGAL, 1999).

A figueira possui folhas características de lobos profundos e coloração variada conforme o cultivar. É caracterizada pela presença de células lactíferas, principalmente nos ramos e pecíolo foliar, que exsudam uma substância denominada de ficina, enzima proteolítica que é responsável por queimaduras quando em contato com a pele.

O sistema radicular da figueira é superficial e fibroso, no geral pouco profundo, podendo estender-se a grandes distâncias quando encontra condições favoráveis (SOUZA; LORENZI 2005).

O figo é um diplóide com número básico de cromossomos $2n=26$, não sendo relatada a existência de indivíduos com outras ploidias. As flores do figo são pequenas, pediceladas, hipóginas e unissexuais com perianto simples pentapartido. Existem três tipos de flores: as pistiladas (femininas) com estilo curto, as pistiladas (femininas) com estilo longo e as estaminadas (masculinas) (RIGITANO, 1964). Produz infrutescência tipo sicônios, equivocadamente chamada de fruto, a qual é muito apreciada por todos os povos sendo comercializada e consumida na forma “*in natura*”, ou processada sob as formas de doces, compotas, em calda ou cristalizada. A fruta é carnosa agregada, na qual os ovários são originados de um aumento na cavidade do receptáculo. Na parte terminal da fruta há um orifício denominado ostíolo, que liga a cavidade do receptáculo com o exterior (SIMÃO, 1998).

Dividem-se em quatro grupos distintos: Caprifigo, Smyrna, Comum e São Pedro. O Roxo de Valinhos e o Pingo de Mel são as principais variedades do grupo Comum, as quais não são polinizadas e não possuem sementes. As frutas do grupo Caprifigo não são comestíveis. As variedades do grupo Smyrna (figo turco) como a Calimyrna são cultivadas no

Oriente Médio, Grécia, Argélia, Portugal e Califórnia (USA), já nas variedades do grupo São Pedro, a principal é a King (CAMPOS, 1994).

Embora existam outras cultivares, o ‘Roxo de Valinhos’ ou clonal similar, também conhecido pelos produtores como Gigante, pelo maior tamanho das frutas, é o único cultivar comercial no Brasil, devido à sua alta produtividade, precocidade, vigor, rusticidade e excelente qualidade dos frutos, com boa aceitação tanto pela indústria quanto pelo consumidor na forma *in natura*. Seus frutos se desenvolvem por partenocarpia, são grandes, periformes, alogandos, com pedúnculo curto, coloração externa roxo-escura, com polpa de cor rosa-violácea e, quando maduros, os frutos são tenros e saborosos (FERREIRA, 2006). De acordo com Penteado (1999), em outros países, essa cultivar apresenta outros sinônimos, tais como ‘San Piero’, ‘Brown Turkey’, ‘Negro d’ Espagne’ e ‘Nero’, entre outros.

2.3 Cultura de tecidos vegetais

2.3.1 Aspectos gerais

A tecnologia de cultura de células, protoplastos e tecidos de plantas, constituem uma das áreas de maior êxito da biotecnologia (LAMEIRA et al., 2000). Após meio século de progresso, conquistou destacada posição na propagação comercial e industrial de plantas. A cultura de tecidos utiliza pequenos fragmentos de tecido *in vivo* (explante) que são utilizados assepticamente em meio nutritivo, onde em cada fragmento de planta ainda que pequeno (inclusive células individuais), permanecem todos os elementos que em condições apropriadas podem reconstruir todo o organismo (TORRES et al., 2000).

As técnicas *in vitro* têm vantagens sobre os métodos da propagação tradicional, pois requerem pequeno espaço para manter ou para aumentar o número de plantas e podem produzir plantas livres de patógenos. Além disso, as taxas de propagação são maiores e, em pouco tempo, pode-se produzir clones de plantas que tem dificuldades de propagação via macropropagação. Outra vantagem desta técnica é a produção das mudas independente da época do ano (GEORGE, 1996).

De acordo com Paiva e Paiva (2001), os fenômenos morfogênicos observados *in vitro* resultam da diferenciação, desdiferenciação ou rediferenciação do explante inicial e podem ser agrupados, conforme a sua natureza, de duas formas diferentes: morfogênese por via direta ou por via indireta. As técnicas por via indireta podem ser empregadas, quando são desejadas variações genéticas nos descendentes, em virtude da possibilidade de obtenção de

variantes em células provenientes do calo. Em contrapartida, a técnica direta pode ser empregada quando se deseja manter a identidade genética do genótipo propagado.

Várias são as técnicas utilizadas no estabelecimento *in vitro* de tecidos vegetais. Santana (2003) relatam que dentre estas, destacam-se a calogênese, suspensão celular, cultura de anteras, meristemas, gemas e embriões, e que a escolha do tipo da técnica a ser empregada varia com a espécie estudada e com o tecido utilizado como explante.

No caso da micropropagação, pode-se produzir mudas com características genéticas idênticas a planta-matriz, permitindo a clonagem de genótipos selecionados, de alta qualidade genética. Além disso, todas as mudas produzidas são uniformes em todas as suas características, o que facilita o manuseio, o transporte e os tratamentos culturais (AUGUSTO, 2001).

A micropropagação pode ser dividida em três fases: 1 – etapa de estabelecimento do cultivo inicial ou primário; 2 – etapa de multiplicação das brotações e 3 – etapa do enraizamento (MURASHIGE, 1974). Uma etapa anterior ao isolamento, que compreende a seleção da planta-matriz fornecedora de explantes e pré-tratamentos para promover uma determinada resposta *in vitro* pode ser considerada como mais uma fase deste processo e outra posterior ao enraizamento, denominada aclimatização que compreende a transferência para o meio ambiente (KRIKORIAN, 1991).

O sucesso da regeneração *in vitro* de plantas a partir de gemas apicais e axilares e explantes nodais tem sido descrito para várias espécies da família Moraceae (MHATRE et al., 1985; HOSSAIN et al., 1992; ALVES, 1993; PATTNAIK et al., 1996; BUCHER, 2002; MURCH et al., 2008).

2.3.2 Estabelecimento do cultivo

a) Fonte de explante

A fonte de explante deve ser cuidadosamente selecionada, uma vez que o tipo de explante utilizado muitas vezes determina o grau de sucesso na micropropagação. Podem ser utilizados diversos tipos de explantes para iniciar a propagação *in vitro*. Para a escolha do explante deve-se levar em conta o nível de diferenciação do tecido e a finalidade da micropropagação. Em geral, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (OLIVEIRA et al., 2004).

No entanto, Grattapaglia e Machado (1998) advertem que, na propagação a partir de embriões e tecidos de sementes, ou ainda de ápices e gemas laterais isolados de plântulas germinadas em condições assépticas, está se propagando um genótipo desconhecido, que pode ou não ser de interesse.

Os explantes devem ser retirados de plantas em crescimento ativo e que não estejam passando por qualquer tipo de estresse como seca, temperaturas excessivamente baixas ou altas, deficiência mineral e ataque de pragas ou doenças (TEIXEIRA et al., 2001).

Sabe-se ainda, que o tamanho do explante depende do objetivo da micropropagação. No caso de eliminação de algum micro-organismo, deve-se utilizar o menor explante possível ou o mais distante de regiões vascularizadas. No entanto, Barbosa et al. (1992), em trabalho de regeneração a partir de meristemas de figueira, obtiveram baixa taxa de sobrevivência. Os autores explicam que essa baixa taxa alcançada pode ter sido causada pelo pequeno tamanho do explante, e sugerem que seria benéfico usar gemas apicais de tamanho maior, no caso do material doador estar livre de doenças, buscando melhorar a taxa de sobrevivência dos explantes.

Demiralay et al., (1997) buscando limpeza viral utilizou como fonte de explantes, meristemas retirados de brotações em diferentes épocas do ano (abril a outubro), concluindo que a época de colheita não afeta a viabilidade e a proliferação de brotos. O mesmo autor relata que os principais problemas do cultivo de meristemas de figueira são o crescimento lento e o escurecimento.

b) Assepsia

Segundo Cid e Zimmermann (2006) um país com as dimensões do Brasil, oferece uma diversidade de climas, microclimas e plantas que estimulam uma ampla gama de interação micro-organismo hospedeiro, por isso, um explante pode alojar uma infinidade de microorganismo localizados externamente ou internamente, tais como bactérias, fungos, vírus, viroides etc, que senão controlados eficientemente antes de inoculá-lo no meio nutritivo, irão contaminar o cultivo inviabilizando as tentativas de micropropagação.

O que se sabe é que na cultura de tecidos é essencial o controle e a prevenção da contaminação microbiana, pois a técnica proporciona um ambiente favorável para o crescimento de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos, constituindo as principais causas de perdas de material vegetal (DANTAS et al., 2002).

Diversas pesquisas têm sido realizadas para a prevenção ou eliminação dos contaminantes do cultivo *in vitro* de plantas, desde o desenvolvimento de protocolos de

assepsia, cuidados com as plantas matrizes, até o uso de produtos antimicrobianos. Há diversos trabalhos com a descrição da desinfecção superficial de tecidos. Em geral, tem-se utilizado a lavagem em água corrente por alguns minutos, e em seguida a imersão dos explantes em solução de etanol a 70%, hipoclorito de sódio (NaClO), hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$), cloreto de mercúrio (HgCl_2), Tween 20, fungicidas e posteriores lavagens sucessivas em água estéril (AUGUSTO, 2001).

O hipoclorito de sódio, fácil de ser encontrado, tem sua ação bactericida devido ao ácido hipocloroso (HOCl) e ao íon OCl^- . A sua atividade está relacionada à sua capacidade oxidante (GEORGE, 1996). O etanol é geralmente utilizado pela sua ação germicida, surfactante e de dissolução das gorduras. Portanto, aplicado inicialmente, pode auxiliar a ação dos outros produtos. O Tween 20 é um detergente, com ação também surfactante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A utilização do cloreto de mercúrio (HgCl_2) tem sido eficiente para muitas espécies. Porém por apresentar alta toxicidade esse produto deve ser utilizado com cuidado (GEORGE, 1996).

Em espécies, onde os níveis de contaminação são elevados, as alternativas mais comuns para conter a proliferação de micro-organismos, consistem em se aumentar a concentração do agente desinfestante ou o tempo de exposição ao mesmo. Entretanto, ambas as alternativas podem comprometer a integridade do tecido objeto do tratamento, surgindo assim, a necessidade de se desenvolver estudos para cada espécie de interesse (MEDEIROS, 1999).

Um dos problemas da micropropagação da figueira por meio de gemas apicais é a alta taxa de contaminação principalmente por bactérias endógenas. Os contaminantes, especialmente as bactérias endógenas, impõem consideráveis limitações mesmo na fase de introdução *in vitro*. Quando a contaminação por micro-organismos é exógena a possibilidade de controle dos principais agentes contaminantes (fungos e bactérias) é considerável. Quando a contaminação é endógena as consequências podem ser limitantes, podendo haver perda de tempo, de recursos financeiros e de material genético (SOUZA et al., 2006).

Segundo Kumar et al. (1998) a assepsia em gemas apicais de figueira (*Ficus carica* L. cv. Gular) utilizando o hipoclorito de sódio (NaClO) 1% durante 5 minutos, o etanol 70% por 30 segundos e o cloreto de mercúrio (HgCl_2) é um método eficiente.

c) Meio de cultivo

São os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas que irão fornecer as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos. Os meios de cultura deverão suprir as demandas normais das plantas, pois as mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas na técnica de cultivo *in vitro*. Mas, além disso, deverão atender às necessidades específicas *in vitro*, já que alguns processos, como a fotossíntese, por exemplo, podem se tornar inativos pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células. Para complementar as substâncias biossintetizadas pela planta, são adicionados vários compostos orgânicos para suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (CALDAS et al., 1998).

Normalmente, os meios nutritivos consistem em uma mistura balanceada de macronutrientes, micronutrientes, carboidratos, fontes orgânicas de nitrogênio, vitaminas e reguladores de crescimento vegetais (GAMBORG; SHYLUK, 1981).

Em relação à água e aos nutrientes minerais, uma planta não pode viver na ausência destes, *in vitro* ou *in vivo*. Já a adição de açúcar ao meio de cultivo, em alguns casos, é muito importante, já que as plantas (ou seus fragmentos) não são completamente autotróficas quando se desenvolvem nestas condições (PIERIK, 1990).

Inicialmente, foram utilizados 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 tecido das plantas está relacionado a 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 de plantas lenhosas e apresenta 1/4 das concentrações de NO_3^- e NH_4^+ do meio MS. Esta diferença é importante quando se procura um meio adequado para as diferentes espécies de plantas e tipos de cultura, pois o conteúdo total de N_2 no meio constitui fator determinante para o crescimento e morfogênese (GEORGE, 1996).

Há também o meio básico B5 desenvolvido por Gamborg et al. (1968), com níveis elevados de NO_3^- e K^+ e baixos de NH_4^+ .

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, 1990).

Estudos realizados por Kumar et al. (1998) comparando o efeito de diferentes meios de cultura em *Ficus carica*, observaram que o meio MS foi mais eficiente na multiplicação e indução de raízes, quando comparado com o meio B5.

Já Barbosa et al. (1992) buscando a produção de mudas de figueira a partir de meristema determinaram dois tipos de meios para o crescimento, proliferação e enraizamento dos explantes. No primeiro, utilizaram sais do meio MS acrescido de 10 mg L^{-1} de tiamina, 2 mg L^{-1} de ácido nicotínico, 12 mg L^{-1} de piridoxina, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 80 mg L^{-1} de cisteína, 30 mg L^{-1} sacarose e $6,4$ de ágar, além dos reguladores de crescimento, com 1 mg L^{-1} de BAP, 3 mg L^{-1} de GA_3 e 1 mg L^{-1} NAA. No segundo, utilizaram meio idêntico ao anterior, com adição de 3 g L^{-1} de carvão ativado.

Contudo, Brum (2001), avaliando o comportamento *in vitro* da cv. Roxo de Valinhos nos meios MS, Knudson, WPM, White e B5, cada um associado a quatro concentrações de sacarose (0, 15, 30 e 45 g L^{-1}), concluiu que o meio WPM proporcionou melhores resultados, como: maior número de brotos, maior comprimento de raiz e parte aérea.

Resultados semelhantes quanto ao meio obteve Ferreira (2006) testando diferentes concentrações do meio WPM e diferentes doses de sacarose na multiplicação de brotações de figueira 'Roxo de Valinhos'. Os melhores resultados foi com a utilização de 100% do meio WPM adicionado de 10 g L^{-1} de sacarose.

Os meios nutritivos podem ser utilizados nas formas semi-sólida ou líquida. Nos meios semi-sólidos, a substância utilizada é o ágar, um polissacarídeo extraído de algas marinhas que dá consistência ao meio servindo de suporte as culturas. O pH do meio induz mudanças na permeabilidade das membranas o que influencia a absorção de certos compostos. Valor de pH mais baixos dificultam a utilização do amônio, enquanto que valores mais altos diminuem a utilização do nitrato. Influencia também na solidificação do ágar no meio (AMARAL, 2006).

Outro fator importante para cultura de tecidos vegetais, é a utilização dos reguladores de crescimento vegetais. Destes, os utilizados com mais frequência são as auxinas e as citocininas, que induzem o crescimento da parte área e a multibrotações. Contudo, nem sempre é benéfica a aplicação de reguladores de crescimento imediatamente após o isolamento do explante da planta-matriz, pois eles podem estimular respostas indesejadas como a formação de calo e, eventualmente, intoxicar os tecidos. Pode ser interessante, em alguns casos, fazer um pré-condicionamento dos explantes, inoculando-os em meio nutritivo sem reguladores de crescimento. Nessa etapa, que pode durar de uma a duas semanas, são detectadas contaminações e observado o comportamento dos explantes, podendo ser selecionados aqueles que melhor resistirem à desinfestação ou que tiver maior vigor (ZIGIOTTO, 2007).

Segundo Ferreira (2006), a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura tem como objetivo principal suprir as deficiências dos teores endógenos de fitormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz. São cinco as classes de fitohormônios: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno.

Dentre os reguladores de crescimento utilizados na fase de multiplicação destacam-se as citocininas, as quais participam de vários processos fisiológicos e de desenvolvimento incluindo a divisão celular, morfogênese da parte aérea e das raízes e senescência (TAIZ; ZEIGER, 2009). De acordo com Zigiotto (2007) as citocininas são indispensáveis para a quebra de dominância apical, indução e proliferação de gemas axilares. O tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. Dentro do grupo de citocininas encontramos a benzilaminopurina (BAP) que tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina por excelência, para a multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias, além de ter menor custo. A razão da maior eficiência do BAP, seguida em ordem decrescente por cinetina (KIN) e isopenteniladenina (2iP), pode estar na capacidade dos tecidos vegetais metabolizar os hormônios naturais mais rapidamente do que os reguladores sintéticos (HU; WANG, 1983).

Outro grupo, também utilizado na cultura de tecidos vegetais são o das auxinas (IAA - ácido indolacético, NAA - ácido naftalenoacético e IBA - ácido indolbutírico), onde as concentrações usadas são freqüentemente baixas se comparadas com as citocininas, para manter um balanço auxina/citocinina menor que 1. Concentrações excessivas de auxina podem inibir a multiplicação ou favorecer demasiadamente o enraizamento ou formação de calo, em detrimento da multiplicação (HU; WANG, 1983).

O NAA (ácido naftalenoacético) e o IBA (ácido indolbutírico) são, normalmente, adicionados em concentrações abaixo de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto o IAA (ácido indol-cético), por ser menos estável em cultura, pode ser adicionado em concentrações superiores (HARTMANN et al., 2002). Já o uso do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), que também é uma auxina, é evitado, pois promove a formação de calos e pode também causar variação genética no cultivo de células ou de tecidos (GEORGE, 1996).

A escolha das citocininas e das auxinas nos cultivos *in vitro* depende de cada pesquisador, porém mesmo com escolhas diferentes, podem-se obter resultados similares. O estabelecimento de brotos e a multiplicação do número destes podem ser promovidos por uma citocinina sem a adição de auxinas. Experimentos com algumas espécies demonstraram que as auxinas podem ser desnecessárias e podem reduzir a capacidade dos brotos de enraizar. Já a

adição de mais de uma citocinina pode aumentar a produção ou melhorar a qualidade dos brotos (GEORGE, 1996).

Além dos reguladores vegetais a quantidade e a forma de elementos minerais essenciais, vitaminas e outros suplementos orgânicos, fonte de carbono, agente geleificante, pH e capacidade tampão do meio são alguns aspectos que também devem ser levados em consideração para a formulação do meio de cultura ideal (CALDAS et al., 1990).

2.3.3 Multiplicação das brotações

Na fase de multiplicação, o principal objetivo é produzir o maior número de plantas possível, no menor espaço de tempo. Entretanto alguns aspectos qualitativos devem ser considerados. Não basta obter altas taxas de multiplicação em alguns explantes. O importante é obter uma taxa média satisfatória com o mínimo de variação de explante para explante. Outro aspecto importante é a qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas, o que irá determinar o sucesso na fase seguinte de enraizamento (ALMEIDA et al., 2002).

A taxa de proliferação ou multiplicação de brotos dependerá da concentração de citocininas aplicadas (GEORGE, 1996). Geralmente, as concentrações altas induzem muitos brotos, mas podem afetar a qualidade destes, produzindo brotos pequenos e incapazes de alongarem-se, dificultando a separação (HARTMANN et al., 2002). Os brotos produzidos podem ainda ter dificuldades para enraizamento, maior suscetibilidade à hiperhidricidade (vitrificação) e podem ser induzidos brotos adventícios. Entretanto, concentrações baixas de citocininas podem estimular somente o crescimento de brotos axilares ou laterais (GEORGE, 1996; HARTMANN et al., 2002).

De acordo com Gunver et al. (1998) em ensaios realizados com a cultivar 'Bursa Siyahi', onde meristemas retirados de plantas adultas foram cultivados em meio MS contendo 1 mg L^{-1} de BAP e 1 mg L^{-1} de NAA, que não houve desenvolvimento de brotações. Já, Kumar et al. (1998) verificaram a indução múltipla de brotos e a regeneração de plântulas através do desenvolvimento de gemas apicais coletadas de plantas adultas de *Ficus carica* cultivar 'Gula', utilizando meio MS suplementado com 2 mg L^{-1} de BAP e $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de NAA.

Outra classe de reguladores de crescimento, as giberelinas, geralmente são utilizadas para induzir alongamento das brotações durante a multiplicação, ou antes, do enraizamento. O principal representante desta classe é o ácido giberélico (GA_3). Quando o GA_3 é adicionado

ao meio de cultura, freqüentemente, produz efeitos similares aos das auxinas (PASQUAL, 2001).

2.3.4 Enraizamento *in vitro*

A fase de enraizamento consiste em transferir as partes aéreas produzidas na fase de multiplicação para um meio adequado à indução de raízes. Entre as fases de enraizamento e multiplicação pode ser necessária uma fase adicional de alongamento das partes aéreas, ou o sistema pode ser simplificado, eliminando-se a etapa de enraizamento *in vitro* pela manipulação das partes aéreas como microestacas, as quais enraizariam diretamente no substrato de transplantio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A etapa de enraizamento caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo o posterior transplantio para condições *ex vitro*. Geralmente, o enraizamento de espécies herbáceas é fácil, porém o mesmo não ocorre com as espécies lenhosas. O enraizamento de lenhosas é dependente da relação entre os níveis de auxina e citocinina, participação de outras substâncias reguladoras de crescimento (por exemplo: as giberelinas e o ácido abscísico), influência de co-fatores e fatores fisiológicos e externos (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

A capacidade de enraizamento pode ser reduzida à medida que se utiliza material menos juvenil, já que essa capacidade diminui quando a planta se aproxima da fase adulta (HARTMANN et al., 2002). Por essa razão às vezes é necessária a restauração da competência de enraizamento por meio do rejuvenescimento das partes aéreas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O rejuvenescimento é considerado como uma reversão da fase adulta para a juvenil, sendo esse obtido por meio de podas severas na planta-matriz, de micro-enxertias consecutivas, sucessivos subcultivos de meristemas apicais e a aplicação de alguns reguladores de crescimento como as giberelinas (SCHUCH et al., 2008).

A rizogênese pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento das raízes. Na fase de indução a capacidade para a formação da raiz é determinada. Já na fase de iniciação visíveis mudanças citológicas ocorrem. Na última fase, o primórdio da raiz pode ser observado histologicamente, ocorrendo em seguida o desenvolvimento das raízes. Essa fase pode ser dividida em organização e alongamento (GEORGE, 1996).

De acordo com Fachinello et al. (2005) o papel das auxinas na indução e no desenvolvimento de raízes tem sido bastante pesquisado, sendo que o ácido indolbutírico

(IBA) é o mais utilizado, por possibilitar boa capacidade de enraizamento e ser menos sensível à degradação biológica, em comparação às demais auxinas sintéticas.

2.4 Micropropagação da figueira

A propagação da figueira pode ser realizada tanto sexuada quanto assexuadamente, mas de modo geral a via sexuada é utilizada exclusivamente para trabalhos de melhoramento genético, isto devido às necessidades específicas para que ocorra a polinização natural da figueira, como a presença da vespa da espécie *Blastophaga psenes*, presença do caprifigo e do progenitor masculino. Desta forma, a propagação comercial da figueira é realizada por via assexuada através de estaquia, mergulhia, alporquia, rebentões ou filhotes (FRÁGUAS, 2003). Entretanto, as mudas podem ser portadoras de patógenos como nematóides (*Meloidigyne* e *Heterodera fici*) ou Vírus do Mosaico, os quais comprometem a qualidade e produtividade do pomar.

Em pomares comerciais deve-se buscar uniformidade de plantas e principalmente dos frutos, de modo que eles devam estar embasados em plantas originadas por processos vegetativos, sendo que um deles pode ser a micropropagação, uma importante técnica para a rápida propagação clonal de plantas, para prover estoques de padrão sanitário, especialmente em espécies frutíferas lenhosas, nas quais a limpeza em relação a doenças não pode ser erradicada depois de introduzidas (WILLIAMSON et al., 1998).

De acordo com Fráguas (2003) muitas espécies ornamentais pertencentes à família Moraceae tem sido micropropagadas de forma satisfatória, como por exemplo, o *Ficus religiosa* (JAISWAL; NARAYAN, 1985), *Ficus lyrata* (DEBERGH; DE WAEL, 1977), *Ficus elastica* e *Ficus benjamina* (MAKINO et al. 1977).

Hu e Guo (1994) citam que os fatores que mais influenciam no desenvolvimento *in vitro* de brotações de figos são: cultivar, tecido cultivado, meio nutritivo e estado da planta matriz.

Encontram-se vários ensaios com diversas variedades de *Ficus carica*, principalmente envolvendo a produção de plantas isentas de vírus por meio da cultura de meristemas, como os realizados por Murithi et al. (1982), Pontikins e Melas (1986), Haelterman e DoCampo (1994), Nobre et al. (1998), Kumar et al. (1998) e Lekçioğlu et al. (2005).

No Brasil, são poucas as pesquisas de cultivo *in vitro* realizadas com a principal cultivar de figueira, o 'Roxo de Valinhos'. Entretanto, alguns autores como Ferreira (2006),

Fráguas (2004), Brum (2001), Anjos Sobrinho et al. (1998) e Barbosa et al. (1992) confirmam a possibilidade da propagação *in vitro* da figueira.

3 DESINFESTAÇÃO DE GEMAS APICAIS DE FIGUEIRA UTILIZANDO HIPOCLORITO DE SÓDIO (NaClO) E CLORETO DE MERCÚRIO (HgCl₂)

Resumo

A micropropagação é uma das técnicas da cultura de tecidos vegetais que vêm sendo utilizada com sucesso, desde a obtenção de mudas saudáveis de diversas espécies até o apoio a programas de melhoramento genético. No entanto, um dos maiores entraves no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas, está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminações provocadas por micro-organismos. O objetivo do trabalho foi desenvolver um protocolo de descontaminação para gemas apicais de figueira, provenientes do campo, utilizando hipoclorito de sódio (NaClO) e cloreto de mercúrio (HgCl₂). Foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro constituído pelas concentrações de 1,25 e 2,5% (v/v) de hipoclorito sódio, combinadas pelos tempos de imersão de 15 e 20 minutos e o segundo constituído por 5 concentrações de cloreto de mercúrio (0,0; 0,05; 0,1; 0,15 e 0,2%) durante 10 minutos. Em ambos os ensaios foram utilizadas gemas apicais de figueira cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante e os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas White (White, 1943), inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (20 g L⁻¹) e 7,0 g L⁻¹ de ágar de acordo com Barbosa et al. (1992). Após trinta dias de incubação, os experimentos foram avaliados por meio das características de explantes contaminados por bactérias, fungos, oxidados e sobreviventes cujos valores foram expressos em percentagem. A imersão dos explantes em 2,5% (v/v) durante 15 minutos foi eficiente para o controle da contaminação fúngica e proporcionou 43,33% de explantes sobreviventes, já o cloreto de mercúrio foi eficiente no controle dos contaminantes (fungos/bactérias), mas demonstrou efeito tóxico nos explantes para as concentrações e o tempo testado.

Palavras chave: Assepsi. *Ficus carica* L. Contaminação. Micropropagação.

DISINFESTATION IN SHOOT APEX OF FIG TREE USING SODIUM HYPOCHLORITE (NaClO) AND MERCURIC CHLORIDE (HgCl₂)

Abstract

Micropropagation is one of the techniques of plant tissue culture that have been used successfully since getting healthy seedlings of various species to support the breeding programs. However, one of the biggest barriers in vitro establishment of woody species, is the difficulty of obtaining tissues free of contamination caused by micro-organisms. The objective was to develop a protocol for the decontamination of fig apical buds from the field, using sodium hypochlorite (NaClO) and mercuric chloride (HgCl₂). Two experiments were conducted, the first being formed by concentrations of 1.25 and 2.5% (v/v) sodium hypochlorite, arranged by immersion for 15 and 20 minutes and the second consisting of five concentrations of mercuric chloride (0.0, 0.05, 0.1, 0.15 and 0.2%) for 10 minutes. In both trials were used apical buds of fig cv. 'Purple Valinhos' Giant selection and the explants were inoculated in test tubes containing 15 mL of MS medium (Murashige and Skoog, 1962), vitamins White (White, 1943), inositol (100 mg L⁻¹), sucrose (20 g L⁻¹) and 7.0 g L⁻¹ agar according to Barbosa et al. (1992). After thirty days of incubation, the experiments were evaluated by means of the characteristics of explants contaminated by bacteria, fungi, oxidation and survivors whose values were expressed as a percentage. The immersion of explants in 2.5% (v/v) for 15 minutes was effective in controlling fungal growth and provided 43.33% of explants survived, since mercuric chloride was effective in controlling contaminants (fungi/ bacteria), but showed toxic effect on the explants at the concentrations and time tested

Key words: Asepsis. *Ficus carica* L. Contamination. Micropropagation.

3.1 Introdução

A propagação da figueira por meio de estacas lenhosas é o processo de multiplicação mais utilizado no Brasil (ALMEIDA; SILVEIRA, 1997). Segmentos destacados da planta matriz são colocados sob condições adequadas e, formando raízes adventícias, originam uma nova planta idêntica àquela que lhe deu origem. Mesmo sendo 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 causadas por patógenos como vírus, fungos e nematóides, reduzindo a qualidade final da muda (FACHINELLO et al., 2005).

Considerando as amplas possibilidades de comercialização e produção do figo tanto para o mercado interno como externo, há necessidade de aperfeiçoamento das técnicas de plantio aliado à obtenção de mudas sadias e isentas de patógenos, favorecendo a formação de frutos dentro dos padrões de qualidade. As diversas técnicas de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais vêm sendo utilizadas com sucesso e com vários objetivos, desde a obtenção de mudas sadias de diversas espécies até o apoio a programas de melhoramento genético (FRÁGUAS, 2003). No entanto, um dos maiores entraves no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas, está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminações provocadas por fungos e bactérias e ainda por oxidações provocadas por compostos fenólicos, podendo chegar inclusive a ser um fator limitante para o estabelecimento e cultivo *in vitro* de certos explantes (SILVA et al., 2003).

Os níveis de contaminação tendem a ser maiores quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo, e mesmo essas sendo submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação são fontes potenciais de micro-organismos (MEDEIROS, 1999).

Várias substâncias com ação germicida são usadas para fazer a desinfestação dos explantes. As mais comuns são os compostos à base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e de cálcio. Outros agentes desinfestantes incluem: cloreto de mercúrio, ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio (MONTARROYOS, 2000).

Dentre os produtos mais comuns usados na assepsia dos explantes, está o hipoclorito de sódio (NaClO) usado geralmente na ordem do 2% ou mais, entre 5-30 minutos. Em processos de biotecnologia vegetal, as soluções de hipoclorito de sódio são amplamente empregadas nos processos assépticos das fontes de explante para o estabelecimento inicial *in*

in vitro de uma série de espécies como peroba-rosa (RIBAS et al., 2003), canjarana (ROCHA, 2005), abacaxi (MORES et al., 2007) e cupuazeiro (FERREIRA, et al., 2009).

Outro produto utilizado para desinfestação de explantes é o cloreto de mercúrio, o qual foi mais eficiente que o hipoclorito de sódio na desinfestação de brotações apicais de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*), possibilitando taxa mais elevada de sobrevivência dos explantes (84,10%). Ribas et al. (2003) recomendaram o tratamento de 0,05% de HgCl₂, durante 10 minutos. No entanto, por ser um produto tóxico, deve ser utilizado com muita cautela (GEORGE, 1996).

O cloreto de mercúrio vem sendo utilizado, com sucesso, em várias espécies que tem sérios problemas de contaminação por micro-organismos como relatado por Fermino Júnior et al. (2009) em *Tectona grandis*, Ribas et al. (2005) em *Aspidosperma polyneuron*, Lemos et al. (2002) em *Saccharum officinarum* e Beck et al. (1998) com *Acacia mearnsii*.

Segundo Barbosa et al. (2008) mesmo com o sucesso obtido em alguns trabalhos realizados com a figueira, muitos aspectos precisam ainda ser pesquisados, entre eles, a descontaminação dos explantes, pois são poucos os trabalhos que comparam os diferentes métodos de desinfestação dos explantes. Além disso, os trabalhos sobre micropropagação não mencionam os níveis de contaminação encontrados.

Este trabalho teve como objetivo testar a eficiência do hipoclorito de sódio (NaClO) e do cloreto de mercúrio (HgCl₂) na desinfestação de gemas apicais de figueira.

3.2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos em março e abril de 2009 no Laboratório de Biotecnologia da à Faculdade de Engenharia da UNESP *Campus* de Ilha Solteira – SP. Foram utilizadas gemas apicais de figueira cv. ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante, procedentes da coleção do campo experimental da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da Faculdade de Engenharia da UNESP, localizada em Selvíria – MS (20°20’28.96” de latitude Sul e 51°24’08.66” de longitude Oeste com altitude média de 367 m). As plantas mantidas na coleção receberam os tratos culturais, foram adubadas e irrigadas de acordo com Rodrigues et al., 2009.

No campo, os ápices caulinares foram coletados, com aproximadamente 10 cm de comprimento, com o auxílio de tesoura, e armazenados em recipientes com água até cobrir todo o material coletado. No laboratório os ápices caulinares foram mantidos em recipiente

com água corrente e 10 gotas de detergente neutro durante trinta minutos. Após a lavagem em água corrente as gemas apicais foram seccionadas com bisturi esterilizado permitindo assim a redução de seu tamanho a aproximadamente 1 cm de comprimento para posteriores tratamentos de assepsia realizados nos experimentos.

Experiemnto (1) Desinfestação de gemas apicais de figueira utilizando hipoclorito de sódio (NaClO):

O experimento foi constituído pelas concentrações de 1,25% e 2,5% (v/v), combinadas pelos tempos de 15 e 20 minutos de imersão. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio composto pelos sais MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas White (White, 1943), inositol (100 mg L^{-1}), sacarose (20 g L^{-1}) e $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar de acordo com Barbosa et al. (1992), com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ esterilizados por autoclavagem ($121 \text{ }^\circ\text{C}$ com $1,05 \text{ kgf cm}^{-2}$, por vinte minutos).

Antes da montagem do experimento foram feitos testes pilotos (dados não apresentados) para a assepsia com as gemas apicais de figueira já seccionadas, e com base nestes foi estabelecido um pré-tratamento, onde fora da câmara de fluxo laminar, os explantes foram: 1º) imersos em etanol 70% durante 1 minuto, lavados 3 vezes com água destilada autoclavada; 2º) imersos em uma solução de 2 g L^{-1} de methiltiofan (fungicida) + 250 mg L^{-1} de cloranfenicol (antibiótico) durante 5 minutos e lavados 3 vezes com água destilada autoclavada; 3º) na sequência os explantes foram imersos durante 5 minutos em 250 mg L^{-1} de ácido cítrico + 250 mg L^{-1} de ácido ascórbico, e por último, já dentro da câmara de fluxo laminar, em ambiente asséptico, foram aplicados os tratamentos. Após a imersão no hipoclorito de sódio, as gemas foram lavadas pelo menos três vezes com água destilada autoclavada e em seguida inoculadas no meio de cultura.

A fase de estabelecimento foi realizada em sala de crescimento com temperatura de $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$. Os explantes foram mantidos durante os 4 primeiros dias no escuro e em seguida em fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de $30 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

As avaliações foram realizadas ao final de 30 dias por meio das características de contaminações bacterianas e fúngicas (determinadas por avaliação visual da presença de fungos e/ou bactérias no meio de cultura e/ou no explante), de explantes oxidados (determinados pela visualização de tecidos oxidados) e sobreviventes (determinados pela análise visual dos explantes sadios) cujos valores foram expressos em percentagem.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, seis repetições e dez tubos por repetição. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Experimento (2) Desinfestação em gemas apicais de figueira utilizando cloreto de mercúrio (HgCl₂):

O experimento foi constituído de cinco concentrações da solução de HgCl₂ (0,0; 0,05; 0,1; 0,15 e 0,2%) durante 10 minutos. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio composto pelos sais MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas White (White, 1943), inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (20 g L⁻¹) e 7,0 g L⁻¹ de ágar de acordo com Barbosa et al. (1992), com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ esterilizados por autoclavagem (121 °C com 1,05 kgf cm⁻², por vinte minutos).

As gemas apicais já seccionadas foram imersas em etanol 70% durante 1 minuto, lavadas três vezes com água destilada autoclavada. Já, dentro da câmara de fluxo laminar, em ambiente asséptico, foram aplicados os tratamentos com as soluções de cloreto de mercúrio. Após a aplicação dos tratamentos as gemas foram lavadas com água destilada autoclavada por seis vezes, durante 5 minutos cada.

A fase de estabelecimento foi realizada em sala de crescimento com temperatura de 22 ± 3 °C. Os explantes foram mantidos durante os 4 primeiros dias no escuro e em seguida em fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

As avaliações foram realizadas ao final de 30 dias por meio das características de contaminações bacterianas e fúngicas (determinadas por avaliação visual da presença de fungos e/ou bactérias no meio de cultura e/ou no explante) e de sobreviventes (determinados pela análise visual dos explantes sadios) cujos valores foram expressos em percentagem.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos, quatro repetições e quinze tubos por repetição. Os dados foram analisados por meio de regressão polinomial.

3.3 Resultados e Discussão

Experimento (1) Desinfestação de gemas apicais de figueira utilizando hipoclorito de sódio (NaClO):

De acordo com a análise de variância, pode-se observar que houve diferença significativa entre a interação doses de hipoclorito de sódio e o tempo de imersão para as

variáveis percentagens de contaminação bacteriana, explantes oxidados e sobreviventes. Para variável contaminação fúngica, houve diferença significativa apenas entre as doses de hipoclorito de sódio ($P < 0,05$) (Tabela 01).

Tabela 01. Quadrados médios das análises de variância e níveis de significância referentes à percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante contaminados por bactérias, fungos, oxidados e sobreviventes. Ilha Solteira – SP, 2009.

Causa de variação	QUADRADOS MÉDIOS			
	Contaminação bacteriana	Contaminação fúngica	Oxidação	Sobreviventes
Hipoclorito (H)	4,16 ^{ns}	2204,16*	16,66 ^{ns}	2204,16*
Tempo (T)	337,50*	4,16 ^{ns}	66,66*	37,50 ^{ns}
H x T	337,50*	37,50 ^{ns}	66,66*	337,50*
CV (%)	15,31	54,73	51,64	34,19

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

ns: não significativo.

Os contaminantes bacterianos manifestaram-se, nos quinze primeiros dias, na base dos explantes e no meio de cultura. A contaminação foi identificada pelo Laboratório de análises clínicas São Marcos, localizado no município de Ilha Solteira (SP) como sendo a bactéria da espécie *Serratia* spp (Figura 01).

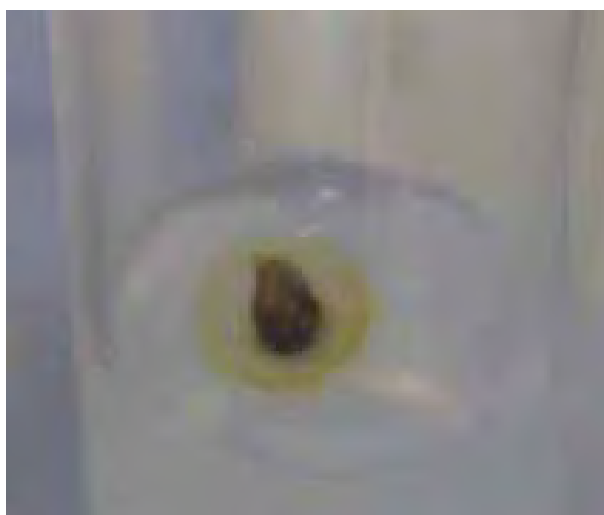


Figura 01. Gema apical de figueira (*Ficus carica* L.) *in vitro* contaminada pela bactéria *Serratia* spp. Ilha Solteira – SP, 2009.

A maior percentagem média de contaminação bacteriana (63,33%) ocorreu no tratamento T₃ (hipoclorito de sódio 1,25% (v/v) em 15 minutos de imersão) (Tabela 02). Com

os resultados observou-se que as doses de hipoclorito de sódio e os tempos de imersão testados não foram eficientes para o controle da contaminação bacteriana.

Tabela 02. Percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante contaminados por bactérias, submetidas a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempos de imersão. Ilha Solteira – SP, 2009.

Tempo de imersão (minutos)	Contaminação Bacteriana (%)	
	Dose de hipoclorito de sódio (%)	
	1,25	2,5
15	63,33 bB	56,67 aA
30	48,38 aA	56,67 aA

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Letras maiúsculas na horizontal e letras minúsculas na vertical).

A baixa eficiência no uso do hipoclorito de sódio para o controle de bactérias pode ser devido à contaminação endógena das gemas por esses micro-organismos. Segundo Anahory et al. (1998) geralmente, espécies do gênero *Serratia* são isoladas de plantas (vegetais, cogumelos, musgo), do trato digestivo dos roedores (40% de pequenos mamíferos silvestres são portadores de *Serratia sp*), insetos, água e do solo. Uma das espécies conhecidas é a *Serratia ficaria* que podem ser isoladas de plantas, de diversos insetos e é encontrada em um determinado nicho ecológico, pois está associada a figueira brava, a figueira cultivada e insetos que desempenham papel importante na fertilização dessas plantas.

De acordo com Souza et al. (2006) os contaminantes, especialmente as bactérias endógenas, impõem consideráveis limitações mesmo na fase de introdução *in vitro*. Quando a contaminação por micro-organismos é exógena a possibilidade de controle dos principais agentes contaminantes (fungos e bactérias) é possível, mas quando a contaminação é endógena pode se tornar fator limitante, podendo ocorrer perda de tempo, de recursos financeiros e de material genético.

Os fungos observados foram principalmente dos tipos filamentosos (bolores), surgindo em grande quantidade de esporos e alta diversidade de espécies (Figura 02).

Não houve influência do tempo de imersão no controle da contaminação fúngica, a menor percentagem de contaminação (0,83%) ocorreu com o uso de 2,5 % (v/v) de hipoclorito de sódio (Tabela 03).



Figura 02. Gema apical de figueira (*Ficus carica* L.) *in vitro* contaminada por fungos. Ilha Solteira – SP, 2009.

Tabela 03. Percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante contaminados por fungos em diferentes tempos de imersão. Ilha Solteira – SP, 2009.

Doses de hipoclorito de sódio (%)	Contaminação Fúngica (%)
1,25	20,00 b
2,5	0,83 a

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram observados por Moraes et al. (2007) estudando a desinfestação de gemas axilares de abacaxi também submetidas a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Kumar et al. (1998) também observaram 95% de eliminação de contaminantes fúngicos em gemas apicais de figueira, utilizando-se do tratamento de imersão das gemas em hipoclorito de sódio. Em protocolo de micropropagação de *Ananas comosus*, Teixeira et al. (2001) recomendam 0,5 a 1,0% de hipoclorito de sódio durante 20 minutos na obtenção de mudas. Cid e Zimmermann (2006) relatam que o uso de compostos químicos como o hipoclorito de sódio, etanol e fungicidas nas doses e tempos certos, podem ser eficientes para o controle da contaminação fúngica em explantes coletados a campo.

A oxidação dos explantes foi avaliada a partir da visualização de tecidos oxidados e os resultados demonstraram que a percentagem de oxidação foi menor utilizando-se 1,25% (v/v) em 15 minutos de imersão (3,33 %) (Tabela 04).

Tabela 04. Percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante oxidados, submetidos a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempos de imersão. Ilha Solteira – SP, 2009.

Tempo de imersão (minutos)	Explantes Oxidados(%)	
	Dose de hipoclorito de sódio (%)	
	1,25	2,5
15	3,33 aA	8,33 aB
30	10,00 bA	8,33 aA

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Letras maiúsculas na horizontal e letras minúsculas na vertical).

A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado ou senescente, especialmente as que contêm alta concentração desses componentes (GEORGE; SHERRINGTON, 1984). Esses compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, inibindo o crescimento dos explantes, além de escurecer o meio de cultura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Uma das possibilidades técnicas para reduzir esse problema inclui a lavagem, em água corrente, dos explantes coletados antes da desinfestação, auxiliando a lixiviação de compostos fenólicos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Foram considerados explantes sobreviventes aqueles que se mantiveram com a coloração verde, sadios e em crescimento (Figura 03).



Figura 03. Gemma apical de figueira (*Ficus carica* L.) *in vitro* sadia e em crescimento (sobrevivente). Ilha Solteira – SP, 2009.

Os dados obtidos demonstraram que a maior percentagem de explantes sobreviventes ocorreu no tratamento T₁ (hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) em 15 minutos de imersão) (Tabela 05).

Tabela 05. Percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante sobreviventes, submetidos a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e tempos de imersão. Ilha Solteira – SP, 2009.

Tempo de imersão (minutos)	Explantes Sobreviventes (%)	
	Dose de hipoclorito de sódio (%)	
	1,25	2,5
15	16,66 aA	43,33 bB
30	26,66 bA	38,33 aA

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Letras maiúsculas na horizontal e letras minúsculas na vertical).

Observa-se que a contaminação bacteriana foi alta, sendo necessários testes com outros desinfestantes. Niedz e Bausher (2002) citam que embora o hipoclorito de sódio seja um dos agentes esterilizantes mais comuns utilizados na cultura de tecidos, sua ação germicida se dá de forma mais efetiva no controle de micro-organismos contaminantes que se encontram na superfície dos tecidos. O desenvolvimento de bactérias, geralmente de natureza endofítica, é de controle mais difícil e, nesse caso, o hipoclorito em solução, mesmo em altas concentrações, não se torna eficiente.

Experimento (2) Desinfestação em gemas apicais de figueira utilizando cloreto de mercúrio (HgCl₂):

A análise de variância mostrou diferenças significativas entre as concentrações de cloreto de mercúrio utilizadas para as variáveis percentagem de contaminação bacteriana, fúngica e explantes sobreviventes (P<005) (Tabela 06).

Tabela 06. Quadrados médios das análises de variância e níveis de significância referentes à percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante contaminados por bactérias, fungos e sobreviventes. Ilha Solteira – SP, 2009.

Causa de variação	QUADRADOS MÉDIOS		
	Explantes		
	Contaminação bacteriana	Contaminação fúngica	Sobreviventes
HgCl ₂	2486,12*	477,53*	506,81*
CV (%)	15,35	43,80	36,15

*significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Durante o estabelecimento *in vitro* de gemas apicais de plantas adultas de figueira, verificou-se que a menor porcentagem de contaminação bacteriana (3,4%) ocorreu com a utilização da concentração de 0,2% de cloreto de mercúrio, e que na mesma concentração a porcentagem de contaminação fúngica chegou a 0% (Figura 04).

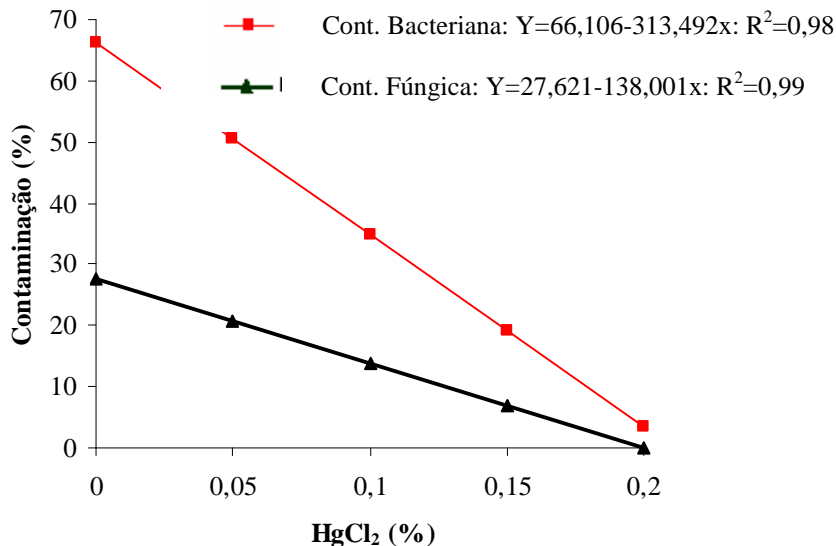


Figura 04. Porcentagem de contaminação bacteriana e fúngica, no controle com HgCl₂ (cloreto de mercúrio) para o estabelecimento *in vitro* de gemas apicais de figueira (*Ficus carica* L.) cv. ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante. Ilha Solteira – SP, 2009.

Entretanto, com o aumento das concentrações de cloreto de mercúrio, foi registrada uma baixa taxa de sobrevivência dos explantes, chegando a 2,9% de sobrevivência na maior concentração (0,2% HgCl₂) (Figura 05).

De maneira geral, pode-se observar que o cloreto de mercúrio foi eficiente para a desinfestação de gemas apicais de figueira, mas que essa espécie é sensível as concentrações mais elevadas no tempo de imersão de 10 minutos. Entretanto autores como Kumar et al. (1998) observaram a eficiência do cloreto de mercúrio a 0,1% durante o tempo de 7 minutos na desinfestação de gemas apicais de *Ficus carica* L cultivar “Gular”. Ribas et al. (2005) observaram em brotações apicais de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*) 84,10% de desinfestação e sobrevivência dos explantes, utilizando 0,05% de cloreto de mercúrio durante 5 minutos. O mesmo aconteceu com Nicoloso et al. (2001), onde relatam que no processo de desinfestação de brotações jovens coletadas em condições *ex vitro*, em Ginseng brasileiro

(*Pfaffia glomerata*), o uso de 0,1% de cloreto de mercúrio por 5 minutos é eficiente na obtenção de plântulas assépticas a partir de segmentos nodais.

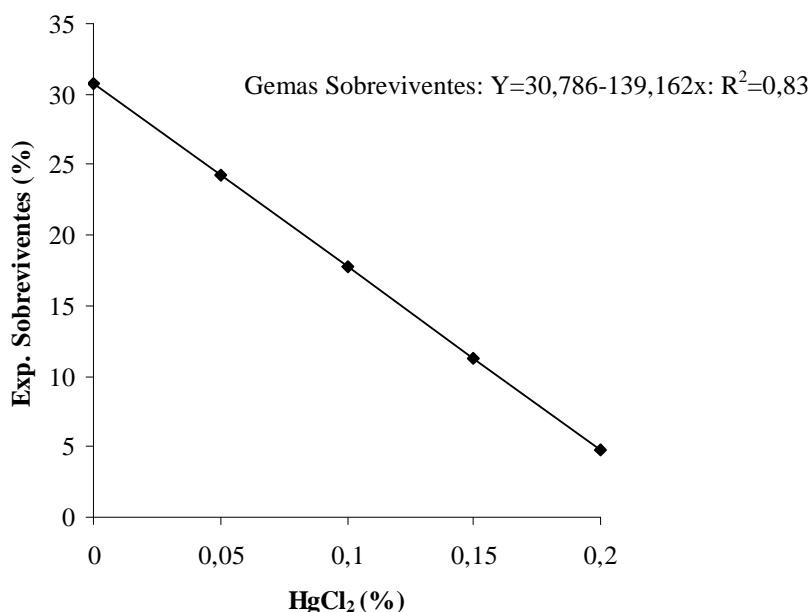


Figura 05. Percentagem de explantes sobreviventes, no controle com HgCl₂ (cloreto de mercúrio) para o estabelecimento *in vitro* de gemas apicais de figueira (*Ficus carica* L.) cv. ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante. Ilha Solteira –SP, 2009.

De acordo com Silva et al. (2002) buscando a assepsia para ápices caulinares de umbu-cajazeira, testaram cinco tempos de imersão (0, 5, 10, 15 e 20 minutos) em solução de cloreto de mercúrio a 0,02%. Desta maneira, observaram que a imersão em solução de cloreto de mercúrio a 0,02% por 10 minutos foi o tratamento mais eficiente em promover a desinfestação em explantes caulinares de umbu-cajazeira.

Segundo George (1996), a concentração e o tempo de exposição aos desinfestantes dependem do material vegetal, sendo que, diferentes partes da planta tem respostas variadas quanto a sensibilidade dos tecidos. O cloreto de mercúrio é mais difícil de ser eliminado e sua eficiência depende do tecido, como por exemplo, embriões de café são muito sensíveis a sua presença, já folhas de café são mais resistentes e podem ser usados níveis de cloreto de mercúrio de 0,1 a 1,0% por 10 minutos (CID; ZIMMERMANN, 2006).

Fermino Júnior et al. (2009) discutem que o sucesso da técnica de micropropagação tem como seu ponto de partida a recomendação de um protocolo de assepsia e estabelecimento *in vitro* com o maior número de explantes assépticos, menor produção de

compostos fenólicos (oxidação) e com maior sobrevivência dos explantes para as etapas seguintes.

3.4 Conclusões

O processo de imersão dos explantes nas doses de hipoclorito de sódio e tempos testados não é eficiente para o controle da contaminação bacteriana.

O controle da contaminação fúngica é eficiente com a utilização de 2,5% (v/v) de hipoclorito de sódio.

O cloreto de mercúrio é eficiente no controle de contaminantes (fungos/bactérias) em gemas apicais de figueira, mas é tóxico para as concentrações e o tempo testado.

4 DESINFESTAÇÃO DE GEMAS APICAIS DE FIGUEIRA UTILIZANDO DIFERENTES ANTIBIÓTICOS

Resumo

A contaminação bacteriana é bastante nociva para os cultivos realizados *in vitro*, principalmente quando a infecção ocorre por bactérias latentes ou endógenas, causando limitações para o estabelecimento *in vitro*. Objetivou-se com este trabalho avaliar a eficiência da descontaminação de gemas apicais de figueira, utilizando diferentes antibióticos adicionados ao meio de cultura. Foram utilizadas gemas apicais de figueira cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante, procedentes do campo. O trabalho foi dividido em dois experimentos: 1º) constituído da adição de antibióticos ao meio de cultura, com os seguintes tratamentos: T₁(sem adição de antibiótico), T₂ (30 mg L⁻¹ de cloranfenicol), T₃ (250 mg L⁻¹ de ampicilina sódica), T₄ (500 mg L⁻¹ de ácido nalidíxico), T₅ (150 mg L⁻¹ de cefalotina sódica), T₆ (500 mg L⁻¹ de tetraciclona) e T₇ (400 mg L⁻¹ de norfloxacina) e 2º) constituído da adição de diferentes doses do antibiótico ampicilina sódica ao meio de cultura, com os seguintes tratamentos: T₁(0 mg L⁻¹), T₂ (100 mg L⁻¹), T₃ (200 mg L⁻¹), T₄ (300 mg L⁻¹) e T₅ (400 mg L⁻¹). Nos dois experimentos o meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas White (White, 1943), inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (20 g L⁻¹) e 7,0 g L⁻¹ de ágar de acordo com Barbosa et al. (1992). As doses do antibiótico correspondentes aos tratamentos foram adicionadas ao meio de cultura após a autoclavagem, dentro da câmara de fluxo laminar. Em ambos os ensaios após trinta dias de incubação, os ensaios foram avaliados por meio das características de explantes contaminados por bactérias, fungos, oxidados e sobreviventes cujos valores foram expressos em percentagem. Com os resultados obtidos observou-se que a adição de antibiótico ao meio de cultura é eficiente para o controle da contaminação bacteriana em gemas apicais de figueira, e o uso de 200 mg L⁻¹ de ampicilina sódica foi eficiente para o controle da contaminação bacteriana e sobrevivência dos explantes.

Palavras chave: Contaminantes. Assepsia. Meio de cultura. *Ficus carica* L.

DISINFESTATION IN SHOOT APEX OF USING DIFFERENT ANTIBIOTICS FIGUEIRA

Abstract

Bacterial contamination is very harmful for the crops carried out in vitro, especially when the infection is bacterial or endogenous latent, causing limitations for establishing in vitro. The objective of this study was to evaluate the efficiency of decontamination of apical buds of the fig tree, using different antibiotics added to the culture medium. Apical buds were fig cv. 'Purple Valinhos' Giant selection, coming from the camp. The work was divided into two experimntos: 1) consists of adding antibiotics to the culture medium, with the following treatments: T1 (without antibiotic), T2 (30 mg L⁻¹ chloramphenicol), T3 (250 mg L⁻¹ ampicillin sodium), T4 (500 mg L⁻¹ nalidícico acid), T5 (150 mg L⁻¹ of cephalothin sodium), T6 (500 mg L⁻¹ tetracicliona) and T7 (400 mg L⁻¹ norfloxacin) and 2) consists of adding different doses of the antibiotic ampicillin sodium to the culture medium, with the following treatments: T1 (0 mg L⁻¹), T2 (100 mg L⁻¹), T3 (200 mg L⁻¹), T4 (300 mg L⁻¹) and T5 (400 mg L⁻¹). In both experiments the culture medium used was MS (Murashige and Skoog, 1962), vitamins White (White, 1943), inositol (100 mg L⁻¹), sucrose (20 g L⁻¹) and 7.0 g L⁻¹ agar according to Barbosa et al. (1992). The corresponding doses of the antibiotic treatments were added to the culture medium after autoclaving, within the laminar flow. In both trials after thirty days of incubation, the assays were evaluated by means of the characteristics of explants contaminated by bacteria, fungi, oxidation and survivors whose values were expressed as a percentage. White the results showed that the addition of antibiotic to the culture medium is effective to control bacterial contamination in apical buds of the fig tree, and the use of 200 mg L⁻¹ of ampicillin sodium was effective to control bacterial contamination and survival of explants.

Key Words: Contaminants. Sterilization. Culture medium. *Ficus carica* L.

4.1 Introdução

A contaminação em cultura de tecidos pode originar-se a partir de micro-organismos encontrados no ar, no tecido de explantes, ou por procedimentos inadequados no laboratório (DEBERGH; ZIMMERMAN, 1993). Torres et al., (1998) recomendam o uso de fungicidas e antibióticos tanto para a desinfestação, quanto adicionados ao meio de cultura, para o controle da contaminação por fungos e bactérias endógenos.

A contaminação bacteriana é bastante nociva para os cultivos realizados *in vitro*, principalmente quando a infecção ocorre por bactérias latentes ou endógenas, introduzidas sistemicamente com os explantes, impondo consideráveis limitações na fase de iniciação *in vitro* (FERREIRA et al., 2009). Os desinfestantes superficiais como álcool ou hipoclorito de sódio, muitas vezes, podem controlar apenas os fungos, mas não garantem níveis aceitáveis de controle para bactérias, o que pode ser constatado por Vianna et al., (2003), os quais utilizaram como descontaminante para os explantes de mamoeiro apenas hipoclorito de sódio em diferentes concentrações, sendo impossível conseguir explantes sem sinais visíveis de contaminação, principalmente por bactérias.

Os explantes, depois de receberem a assepsia superficial, podem ser transferidos para meio nutritivo contendo antibiótico (GRATTAPAGLIA; MACHADO 1998). Esses autores citam que o antibiótico deve ser esterilizado a frio e adicionado ao meio antes da sua solidificação, e também apresentar um amplo espectro de ação.

Para o controle das bactérias durante o estabelecimento *in vitro*, diversos autores citam a inclusão de antibióticos ao meio de cultura, em cafeeiro (VANETTI; OLIVEIRA, 2002), em estrelícia (PAIVA et al., 2004), em helicônia (RODRIGUES, 2005) e em bananeira (BOBROFF et al., 2009; PEREIRA et al., 2010).

Biasi (1995) testou a adição, ao meio de cultura, de diferentes doses dos antibióticos ácido nalidíxico, cloranfenicol e estreptomicina, para o controle *in vitro* de bactérias, em segmentos nodais e discos foliares de abacateiro. Pereira et al. (2003) observaram que a adição dos antibióticos ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina em concentrações que variam de 32 a 256 mg.L⁻¹ inibem o crescimento de bactérias contaminantes na cultura de tecidos da batata.

Um dos problemas verificados na micropropagação da figueira, através de gemas apicais, é a alta taxa de contaminação, principalmente por bactérias endógenas. Portanto, este trabalho teve por objetivo verificar a eficiência da descontaminação de gemas apicais de figueira, utilizando diferentes antibióticos adicionados ao meio de cultura.

4.2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos em maio e junho de 2009 no Laboratório de Biotecnologia da à Faculdade de Engenharia da UNESP *Campus* de Ilha Solteira – SP. Foram utilizadas gemas apicais de figueira cv. ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante, procedentes da coleção do campo experimental da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da Faculdade de Engenharia da UNESP, localizada em Selvíria – MS (20°20’28.96” de latitude Sul e 51°24’08.66” de longitude Oeste com altitude média de 367 m). As plantas mantidas na coleção receberam os tratos culturais, foram adubadas e irrigadas de acordo com Rodrigues et al., 2009.

No campo, os ápices caulinares foram coletados, com aproximadamente 10 cm de comprimento, com o auxílio de tesoura, e armazenados em recipientes com água até cobrir todo o material coletado. No laboratório os ápices caulinares foram mantidos em recipiente com água corrente e 10 gotas de detergente neutro durante trinta minutos. Após a lavagem em água corrente as gemas apicais foram seccionadas com bisturi esterilizado permitindo assim a redução de seu tamanho a aproximadamente 1 cm de comprimento para posteriores tratamentos de assepsia realizados nos experimentos.

Experimento (1): Avaliação da ação de antibióticos na regeneração de gemas apicais de figueira (*Ficus carica* L.)

Dos ápices caulinares, com aproximadamente 10 cm de comprimento retirou-se as gemas que foram utilizadas como fonte de explante. Estas gemas foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio composto pelos sais MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas White (White, 1943), inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (20 g L⁻¹) e 7,0 g L⁻¹ de ágar de acordo com Barbosa et al. (1992), suplementado com diferentes concentrações de antibióticos, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1 esterilizados por autoclavagem (121 °C com 1,05 kgf cm⁻², por vinte minutos).

Sete combinações de antibióticos foram averiguadas: (T₁) sem adição de antibiótico; (T₂) 30 mg L⁻¹ de cloranfenicol; (T₃) 250 mg L⁻¹ de ampicilina sódica; (T₄) 500 mg L⁻¹ de ácido nalidídico; (T₅) 150 mg L⁻¹ de cefalotina sódica, (T₆) 500 mg L⁻¹ de tetraciclona e (T₇) 400 mg L⁻¹ de norfloxacin. Os antibióticos e as doses testadas foram estabelecidos de acordo com os trabalhos realizados por Pereira et al. (2003), Pereira e Fortes (2003) com explantes de batata, Donato et al. (2005) com cana-de-açúcar e por Naue et al. (2007) com tabaco.

As doses do antibiótico correspondentes aos tratamentos foram adicionadas ao meio de cultura após a autoclavagem, dentro da câmara de fluxo laminar.

Para desinfestação superficial dos explantes, os mesmos foram submetidos a um protocolo previamente estabelecido, realizado fora da câmara de fluxo laminar. Neste caso foram realizadas as seguintes etapas: 1º) os explantes foram imersos em etanol 70% durante 1 minuto, lavados 3 vezes com água destilada autoclavada; 2º) imersos em uma solução de 2 g L⁻¹ de methiltiofan (fungicida) + 250 mg L⁻¹ cloranfenicol (antibiótico) durante 5 minutos e lavados 3 vezes com água destilada autoclavada; 3º) na seqüência os explantes foram imersos durante 5 minutos em 250 mg L⁻¹ de ácido cítrico + 250 mg L⁻¹ de ácido ascórbico e 4º) imersos em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v), sob agitação constante, durante 15 minutos e a lavagem dos mesmos foi realizada dentro da câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, onde as gemas foram inoculadas ao meio de cultura com os respectivos tratamentos.

A fase de estabelecimento foi realizada em sala de crescimento com temperatura de 22 ± 3 °C. Os explantes foram mantidos durante os 4 primeiros dias no escuro e em seguida em fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹.

Aos 30 dias, avaliaram-se as contaminações bacterianas (determinadas por avaliação visual da presença de bactérias no meio de cultura e/ou no explante), de explantes oxidados (determinados pela visualização de tecidos oxidados) e sobreviventes (determinados pela análise visual dos explantes sadios) cujos valores foram expressos em percentagem.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com sete tratamentos, cinco repetições e sete gemas por repetição e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Experimento (2): Avaliação da Ampicilina Sódica na regeneração de gemas apicais de (*Ficus carica* L.)

Dos ápices caulinares, com aproximadamente 10 cm de comprimento retirou-se as gemas que foram utilizadas como fonte de explante. Estas gemas foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio composto pelos sais MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas White (White, 1943), inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (20 g L⁻¹) e 7,0 g L⁻¹ de ágar de acordo com Barbosa et al. (1992), suplementado com diferentes concentrações de antibióticos, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1 esterilizados por autoclavagem (121 °C com 1,05 kgf cm⁻², por vinte minutos).

Cinco concentrações do antibiótico Ampicilina Sódica foram averiguadas (0, 100, 200, 300 e 400 mg L⁻¹ de Ampicilina Sódica). O uso da ampicilina sódica e as doses testadas foram decididas de acordo com os resultados obtidos no primeiro experimento. As doses do antibiótico correspondentes aos tratamentos foram adicionadas ao meio de cultura após a autoclavagem, dentro da câmara de fluxo laminar.

Para desinfestação superficial dos explantes, os mesmos foram submetidos a um protocolo previamente estabelecido, realizado fora da câmara de fluxo laminar. Neste caso foram realizadas as seguintes etapas: 1º) os explantes foram imersos em etanol 70% durante 1 minuto, lavados 3 vezes com água destilada autoclavada; 2º) imersos em uma solução de 2 g L⁻¹ de methiltiofan (fungicida) + 250 mg L⁻¹ cloranfenicol (antibiótico) durante 5 minutos e lavados 3 vezes com água destilada autoclavada; 3º) na seqüência os explantes foram imersos durante 5 minutos em 250 mg L⁻¹ de ácido cítrico + 250 mg L⁻¹ de ácido ascórbico e 4º) imersos em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v), sob agitação constante, durante 15 minutos e a lavagem dos mesmos foi realizada dentro da câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, onde as gemas foram inoculadas ao meio de cultura com os respectivos tratamentos.

A fase de estabelecimento foi realizada em sala de crescimento com temperatura de 22 ± 3 °C. Os explantes foram mantidos durante os 4 primeiros dias no escuro e em seguida em fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹.

Aos 30 dias, avaliaram-se as contaminações bacterianas (determinadas por avaliação visual da presença de bactérias no meio de cultura e/ou no explante), de explantes oxidados (determinados pela visualização de tecidos oxidados) e sobreviventes (determinados pela análise visual dos explantes sadios) cujos valores foram expressos em percentagem.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, dez repetições e três gemas por repetição e os dados foram analisados por meio de regressão polinomial.

4.3 Resultados e Discussão

Experimento (1): Avaliação da ação de antibióticos na regeneração de gemas apicais de figueira (*Ficus carica* L.)

A análise de variância dos dados obtidos mostrou que houve diferença significativa entre os antibióticos testados para percentagem de contaminação bacteriana, explantes oxidados e sobreviventes ($P < 0,05$) (Tabela 07).

Tabela 07. Quadrados médios das análises de variância e níveis de significância referentes à percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante contaminados por bactérias, oxidados e sobreviventes. Ilha Solteira – SP, 2009.

QUADRADOS MÉDIOS			
Causa de variação	Explantes		
	Contaminação bacteriana	Oxidados	Sobreviventes
Antibióticos	1331,76*	1590,95*	868,26*
CV (%)	59,91	37,65	20,61

significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

O teste de médias para a variável percentagem de contaminação bacteriana, mostrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos (T₁) sem antibiótico e (T₅) cefalotina sódica 150 mg L⁻¹, nos quais se observaram maior percentagem de contaminação, 51,43% e 39,14% respectivamente. Entre os demais tratamentos (T₂) cloranfenicol 30 mg.L⁻¹, (T₃) ampicilina sódica 250 mg L⁻¹, (T₄) ácido nalidíxico 500 mg L⁻¹, (T₆) tetraciclina 500 mg L⁻¹ e (T₇) norfloxacina 400 mg L⁻¹ também não houve diferença significativa, ocorrendo as menores percentagens de contaminação (Tabela 08).

Tabela 08. Percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante contaminados por bactérias, oxidados e sobreviventes, submetidos a diferentes antibióticos adicionados ao meio de cultura. Ilha Solteira – SP, 2009.

Tratamentos Antibióticos (mg L ⁻¹)	Explantes		
	Contaminação bacteriana (%)	Gemas Oxidadas (%)	Sobreviventes (%)
sem adição de antibiótico	51,43 a	3,58 c	39,78 c
30 mg L ⁻¹ de cloranfenicol	13,44 b	30,82 ab	51,43 bc
250 mg L ⁻¹ de ampicilina sódica	00,60 b	0,00 c	90,69 a
500 mg L ⁻¹ de ácido nalidíxico	00,60 b	24,98 ab	66,50 b
150 mg L ⁻¹ de cefalotina sódica	39,14 a	8,91 bc	45,05 bc
500 mg L ⁻¹ de tetraciclona	5,31 b	54,42 a	34,12 c
400 mg L ⁻¹ de norfloxacina	5,00 b	51,43 a	33,50 c

Valores seguidos por letras iguais na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A cefalotina sódica na dose testada (150 mg L^{-1}) foi ineficiente para o controle da contaminação bacteriana em gemas apicais de figueira. Entretanto, Ferreira et al. (2009) constataram que a utilização de 300 mg L^{-1} deste antibiótico, no meio de cultura, é essencial para o controle da contaminação em explantes florais de cupuaçu, permitindo o seu estabelecimento *in vitro*. Duhem et al. (1988), em estudos com café e cacau, observaram que a presença da cefalotina sódica no meio de cultivo, promovia o controle da contaminação, além de não causar efeito tóxico às plantas. Resultados semelhantes foram observados por Rodrigues (2005), onde a concentração de 500 mg L^{-1} de cefalotina sódica foi a mais eficiente de controle dos micro-organismos em helicônia. Costa et al. (2007) verificaram que a utilização do antibiótico cefalotina proporcionou um efeito positivo no controle do crescimento bacteriano e sobrevivência e explantes de alecrim-pimenta.

Os tratamentos (T_2) cloranfenicol 30 mg L^{-1} , (T_3) ampicilina sódica 250 mg L^{-1} , (T_4) ácido nalidíxico 500 mg L^{-1} , (T_6) tetraciclina 500 mg L^{-1} e (T_7) norfloxacina 400 mg L^{-1} demonstraram-se eficientes no controle bacteriano em gemas apicais de figueira, Pereira et al. (2003) estudando bactérias endofíticas contaminantes da cultura *in vitro* da batata, observaram que entre doze antibióticos testados, seis apresentaram algum tipo de controle e, destes, os melhores resultados para a inibição do crescimento bacteriano foram proporcionados pela ampicilina, pelo cloranfenicol, pela estreptomicina e pela tetraciclina em concentrações que variam de 32 a 256 mg L^{-1} .

Observaram-se diferenças significativas entre as médias dos tratamentos em relação à percentagem de oxidação dos explantes, onde os tratamentos (T_3) ampicilina sódica 250 mg L^{-1} , (T_1) sem antibiótico e (T_5) cefalotina sódica 150 mg L^{-1} apresentaram as menores percentagens de oxidação, 0; 3,58 e 8,91% respectivamente (Tabela 08). A maior percentagem de explantes sobreviventes, após 30 dias de incubação, foi verificada no tratamento (T_3) ampicilina sódica 250 mg L^{-1} , onde 90, 69% dos explantes mantiveram-se vivos e em desenvolvimento.

Os dados estão de acordo com Pereira e Fortes (2003), quando observando a toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* de explantes de batata e relatam que a adição de ampicilina sódica no meio de cultura não afetou a sobrevivência e o desenvolvimento dos explantes. Entretanto, as menores taxas de sobrevivência dos explantes foram observadas na presença de cloranfenicol e tetraciclina, concordando com o que foi observado com os explantes de figueira.

Um dos fatores limitantes ao uso dos antibióticos adicionados ao meio nutritivo juntamente com o explante, é a fitotoxidez dessas substâncias, principalmente devido ao uso

comum de concentrações elevadas. Segundo Cid e Zimmermann (2006) os antibióticos podem afetar a processos sensíveis dentro da bactéria (síntese de proteína, ácidos nucleicos), e como a nível molecular estes processos são parecidos com os da célula vegetal, torna-se necessário ficar atento a problemas de fitotoxicidade, os quais, também são consequências da concentração usada.

A tetraciclina é considerada um antibiótico de amplo espectro de ação, mesmo assim, seu uso deve ser considerado restrito na cultura de tecidos, justamente pelo alto grau de fitotoxicidade (POLLOCK et al., 1983). A ação fitotóxica ocorre, principalmente, em virtude de distúrbios da síntese protéica e ação inibitória na síntese de ARNs e ATPs, interferindo, desta forma, nos sistemas energéticos da planta (PRADO FILHO, 1975). De acordo com Pollock et al. (1983) há eficiência no controle de contaminações quando os tratamentos com este antibiótico são feitos durante curtos períodos.

Quanto à fitotoxicidade do cloranfenicol, pode ter ocorrido porque este antibiótico é inibidor da síntese protéica em plantas podendo, em alguns casos, interferir no desenvolvimento de cloroplastos e mitocôndrias (LEIFERT et al., 1991).

Experimento (2): Avaliação da Ampicilina Sódica na regeneração de gemas apicais de (*Ficus carica* L.)

Houve diferença significativa entre as diferentes doses de ampicilina sódica em relação a percentagem de contaminação bacteriana e explantes sobreviventes ($P < 0,05$) (Tabela 09).

Tabela 09. Quadrados médios das análises de variância e níveis de significância referentes à percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv.'Roxo de Valinhos seleção Gigante contaminados com bactéria e sobreviventes. Ilha Solteira - SP, 2009.

QUADRADOS MÉDIOS		
Causa de variação	Explantes	
	Contaminação bacteriana	Sobreviventes
Doses de ampicilina sódica	6066,00*	6303,00*
CV (%)	17,56	8,68

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

A percentagem de contaminação bacteriana e explantes sobreviventes durante a fase de estabelecimento, com a adição do antibiótico ampicilina sódica ao meio de cultura estão representadas nas figuras 7 e 8 respectivamente. Os resultados indicaram que a contaminação bacteriana diminuiu à medida que se aumentou a dose de ampicilina sódica adicionada ao meio de cultura, e que não houve diferença significativa em relação a essa variável entre as doses de 200, 300 e 400 mg L⁻¹ de ampicilina sódica, com média de 13, 48% de contaminação bacteriana na dose de 200 mg L⁻¹ (Figura 06).

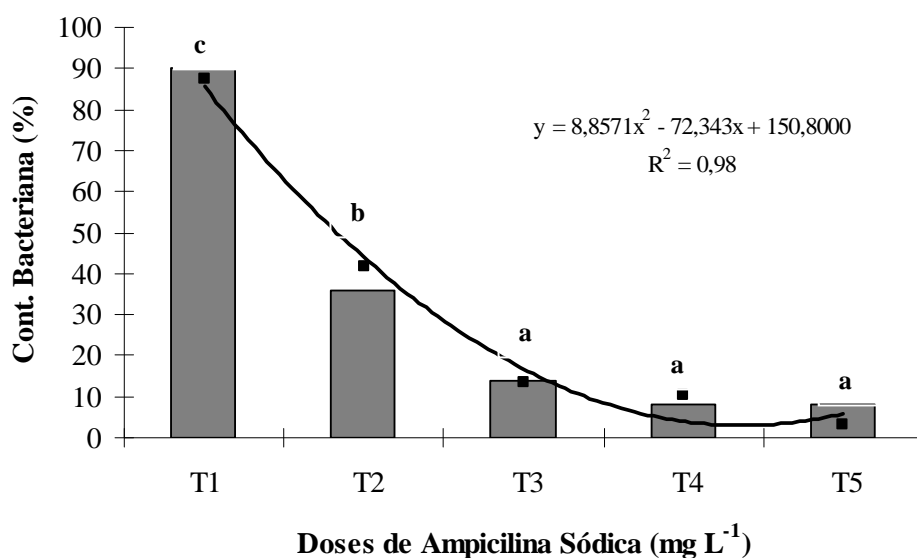


Figura 06. Percentagens médias de contaminação bacteriana, no controle com antibiótico ampicilina sódica, para o estabelecimento *in vitro* de gemas apicais de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante. Ilha Solteira – SP, 2009.

Com relação à sobrevivência dos explante observou-se que não houve diferença entre as doses de 200, 300 e 400 mg L⁻¹ de ampicilina sódica adicionadas ao meio de cultura, e que à medida que ocorreu o controle da contaminação bacteriana, os explantes mantiveram-se vivos, não havendo problemas de toxidez em relação ao uso desse antibiótico adicionado ao meio de cultura, com 200 mg L⁻¹ de ampicilina sódica a média de explantes sobreviventes foi de 86,5% (Figura 07).

Pereira e Fortes (2003) obtiveram resultados semelhantes ao observarem a toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* de explantes de batata Baronesa, os autores testaram diferentes doses de ampicilina sódica (0, 32, 64, 128, 256, 512 e 1.024 mg L⁻¹) adicionados ao meio e relatam que a adição do antibiótico não afetou a sobrevivência e o desenvolvimento dos explantes, mesmo com dosagens altas deste antibiótico (1.024 mg L⁻¹), com cerca de

100% de sobrevivência dos explantes, após 21 dias de cultivo, indicando não ter havido efeito fitotóxico deste antibiótico.

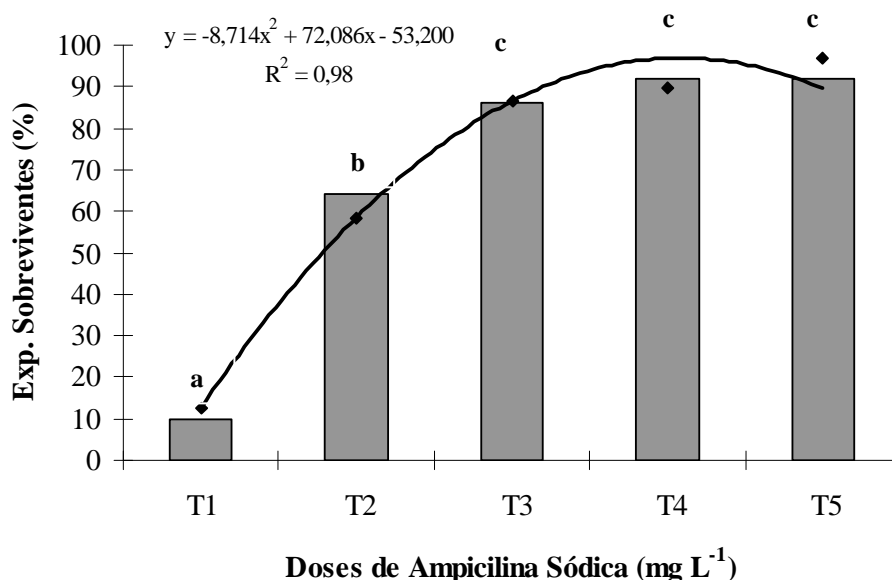


Figura 07. Percentagens médias de explantes sobreviventes, no controle com antibiótico ampicilina sódica, para o estabelecimento *in vitro* de gemas apicais de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante. Ilha Solteira – SP, 2009.

Koneman et al. (2001) cita que antibióticos pertencentes ao grupo dos betalactanos, como a ampicilina e a carbenicilina, as cefalosporinas (cefotaxime, cefaloridina, cefalotina) e a rifampicina, são considerados antibióticos de amplo espectro, ativos contra bactérias gram positivas e negativas, sendo também pouco ou não tóxicos aos cultivos *in vitro*. Fato esse que se deve possivelmente, a sua ação sobre sítios específicos da parede celular bacteriana, os quais não ocorrem em células de plantas (POLLOCK et al. 1983).

4.4 Conclusões

A adição de antibiótico ao meio de cultura é eficiente para o controle da contaminação bacteriana em gemas apicais de figueira.

O uso de 200 mg L⁻¹ de ampicilina sódica é eficiente para o controle da contaminação bacteriana e sobrevivência dos explantes.

5 CONTAMINAÇÃO BACTERIANA EM GEMAS APICAIS DE DIFERENTES VARIEDADES DE FIGUEIRA

Resumo

A micropropagação é muito utilizada para conservação de germoplasma e produção de mudas básicas de novas cultivares desenvolvidas pelos programas de melhoramento genético. O objetivo do trabalho foi avaliar eventuais diferenças no controle de contaminação bacteriana em gemas apicais de diferentes variedades de figueira. Os tratamentos foram constituídos das seguintes variedades: T₁ (White Adriatic), T₂ (White Genoa), T₃ (Pingo de mel IAC), T₄ (Roxo de Valinhos IAC), T₅ (Palestino), T₆ (Pingo de mel Ilha Solteira), T₇ (Black Portugal), T₈ (Roxo de Valinhos seleção P 42), T₉ (Roxo de Valinhos seleção P 48), T₁₀ (Mission Monte Alto), T₁₁ (Mini Figo Piracicaba), T₁₂ (Brown Turkey Piracicaba), T₁₃ (Mini Figo Pelotas) e T₁₄ (Troiano Adamantina). Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio composto pelos sais MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas White (White, 1943), inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (20 g L⁻¹) e 7,0 g L⁻¹ de ágar de acordo com Barbosa et al. (1992), suplementado com 200 mg L⁻¹ de ampicilina sódica. As avaliações foram realizadas ao final de 30 dias por meio das características de contaminações bacterianas e fúngicas (determinadas por avaliação visual da presença de fungos e/ou bactérias no meio de cultura e/ou no explante), de explantes oxidados (determinados pela visualização de tecidos oxidados) e sobreviventes (determinados pela análise visual dos explantes sadios) cujos valores foram expressos em percentagem. Conclui-se que as variedades White Adriatic e White Genoa respondem de forma diferente as demais variedades testadas, em relação a oxidação e sobrevivência das gemas apicais, após serem submetidas as mesmas condições de assepsia e meio nutritivo.

Palavras chave: *Ficus carica* L. Micropropagação. Assepsia. Germoplasma.

BACTERIAL CONTAMINATION IN SHOOT APEX OF DIFFERENT VARIETIES OF FIG TREE

Abstract

Micropropagation is widely used for germplasm conservation and basic plant propagation of new cultivars developed by breeding programs. The objective was to evaluate possible differences in the control of bacterial contamination in apical buds of different varieties of fig. The treatments consisted of the following varieties: T1 (White Adriatic), T2 (White Genoa), T3 (Pingo honey IAC), T4 (Purple Valinhos IAC), T5 (Palestine), T6 (Pingo Honey Island Single) T7 (Black Portugal), T8 (Purple Valinhos selection P 42), T9 (Purple Valinhos selection P 48), T10 (Mission Monte Alto), T11 (Mini Figo Piracicaba), T12 (Brown Turkey Piracicaba), T13 (Mini Figo Pelotas) and T14 (Troiano Adamantina). The explants were inoculated in test tubes containing 15 mL of medium composed of MS salts (Murashige and Skoog, 1962), vitamins White (White, 1943), inositol (100 mg L^{-1}), sucrose (20 g L^{-1}) and 7.0 g L^{-1} agar according to Barbosa et al. (1992), supplemented with 200 mg L^{-1} of ampicillin sodium. Evaluations were performed at 30 days by the characteristics of bacterial and fungal contamination (determined by visual assessment of fungi and / or bacteria in the culture medium and/or explant), explants oxidation (determined by viewing tissues oxidized) and survivors (determined by visual analysis of explants of healthy people) whose values were expressed as a percentage. We conclude that the varieties White Genoa and White Adriatic respond differently to the other varieties tested, for oxidation and survival of apical buds, after undergoing the same aseptic conditions and nutrient medium.

Key Words: *Ficus carica* L. Micropropagation. Asepsi. Germplasm.

5.1 Introdução

A figueira *Ficus carica* L., pertence à família Moraceae e é composta por cerca de 60 gêneros com mais de 2000 espécies, e no estado de São Paulo existem cerca de 25 cultivares diferentes de figueira, sendo a Roxo de Valinhos a mais cultivada comercialmente. Esta cultivar, mesmo sendo muito produtiva, tem pouca resistência a pragas, como nematóides. Assim, o cultivo e conservação em bancos de germoplasma de outras variedades de figueira comum torna-se de extrema importância, dado a grande importância econômica da cultura e o risco de erradicação do cultivo comercial por pragas e doenças (CHALFUN et al., 2002).

Técnicas modernas de biotecnologia como a cultura de tecidos, a manipulação genética e a biologia molecular estão sendo utilizadas para o melhoramento genético de plantas, permitindo assim o desenvolvimento de novas variedades. (PEREIRA et al., 2010). Dentre as diversas práticas da cultura de tecidos uma das mais utilizadas é a micropropagação, onde as principais vantagens são, as altas taxas de multiplicação em comparação aos métodos tradicionais e a eliminação de doenças promovendo uma alta qualidade fitossanitária das mudas. Além disso, a micropropagação é muito utilizada para conservação de germoplasma e produção de mudas básicas de novas cultivares desenvolvidas pelos programas de melhoramento genético (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Um dos princípios básicos para o sucesso da cultura de tecidos são o controle e prevenção da contaminação microbiana, pois esta técnica proporciona um ambiente favorável para o crescimento de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos (SILVA et al., 2003). Quando a contaminação é exógena a possibilidade de controle dos principais agentes contaminantes (fungos e bactérias) é considerável, mas quando a contaminação é endógena as consequências podem ser limitantes, podendo resultar em perda de tempo, de recursos financeiros e de material genético (SOUZA et al., 2006).

Segundo Azevedo et al. (2000), micro-organismos endofíticos são aqueles que habitam o interior da planta em pelo menos um período do seu ciclo de vida não provocando nenhum dano aparente. A *Serratia ficaria* é uma espécie de bactéria encontrada em um determinado nicho ecológico, que está associada a figueira brava, a figueira cultivada e insetos que desempenham um papel importante na fertilização dessas plantas (ANAHORY et al., 1998), mas essa bactéria acaba tornando-se um problema para a micropropagação da figueira pois compete com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura, podendo também eliminar no meio metabólitos tóxicos e ocasionar a morte da plântula.

Diferentes métodos de assepsia têm sido testados em várias espécies, uma vez que cada espécie, em vários experimentos, tem mostrado comportamento diferenciado, resultado provável da influência dos genótipos em relação aos métodos adotados (PEREIRA et al., 2003). Diversos trabalhos realizados com diferentes cultivares de bananeira, indicam diferentes métodos de assepsia são empregados demonstrando que, para cada cultivar de banana, é necessário ajustes para melhorar a eficiência no processo de desinfestação e estabelecimento *in vitro* (OLIVEIRA, 2010; HABIBA et al., 2002; BRAGA et al., 2001)

Neste trabalho, o objetivo foi verificar o efeito do genótipo no controle de contaminação bacteriana em gemas apicais de diferentes variedades de figueira (*Ficus carica* L.).

5.2 Material e Métodos

O trabalho foi realizado em agosto de 2009 no Laboratório de Biotecnologia pertencente à Faculdade de Engenharia da UNESP Campus de Ilha Solteira – SP. Foram utilizadas gemas apicais de diferentes variedades de figueira (*Ficus carica* L.), procedentes da coleção do campo experimental da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da Faculdade de Engenharia da UNESP, localizada em Selvíria – MS (20°20'28.96" de latitude Sul e 51°24'08.66" de longitude Oeste com altitude média de 367 m). As plantas mantidas na coleção receberam os tratamentos culturais, foram adubadas e irrigadas de acordo com Rodrigues et al., 2009.

No campo, os ápices caulinares foram coletados, com aproximadamente 10 cm de comprimento, com o auxílio de tesoura, e armazenados em recipientes com água até cobrir todo o material coletado. No laboratório os ápices caulinares foram mantidos em recipiente com água corrente e 10 gotas de detergente neutro durante trinta minutos. Após a lavagem em água corrente as gemas apicais foram seccionadas com bisturi esterilizado permitindo assim a redução de seu tamanho a aproximadamente 1 cm de comprimento para posteriores tratamentos de assepsia realizados nos experimentos.

Foram averiguadas as variedades: (T₁) White Adriatic, (T₂) White Genoa, (T₃) Pingo de mel IAC, (T₄) Roxo de Valinhos IAC, (T₅) Palestino, (T₆) Pingo de mel Ilha Solteira, (T₇) Black Portugal, (T₈) Roxo de Valinhos seleção P 42, (T₉) Roxo de Valinhos seleção P 48, (T₁₀) Mission Monte Alto, (T₁₁) Mini Figo Piracicaba, (T₁₂) Brown Turkey Piracicaba, (T₁₃) Mini Figo Pelotas e (T₁₄) Troiano Adamantina.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio composto pelos sais MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas White (White, 1943), inositol (100 mg L^{-1}), sacarose (20 g L^{-1}) e $7,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar de acordo com Barbosa et al. (1992), suplementado com 200 mg L^{-1} de ampicilina sódica, com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ esterilizados por autoclavagem ($121 \text{ }^\circ\text{C}$ com $1,05 \text{ kgf cm}^{-2}$, por vinte minutos). A ampicilina sódica foi adicionada ao meio de cultura após a autoclavagem, dentro da câmara de fluxo laminar.

Antes da montagem do experimento foram feitos testes pilotos (dados não apresentados) para a assepsia com as gemas apicais de figueira já seccionadas, e com base nestes foi estabelecido um pré-tratamento, onde fora da câmara de fluxo laminar, os explantes foram: 1º) imersos em etanol 70% durante 1 minuto, lavados 3 vezes com água destilada autoclavada; 2º) imersos em uma solução de 2 g L^{-1} de methiltiofan (fungicida) + 250 mg L^{-1} de cloranfenicol (antibiótico) durante 5 minutos e lavados 3 vezes com água destilada autoclavada; 3º) na sequência os explantes foram imersos durante 5 minutos em 250 mg L^{-1} de ácido cítrico + 250 mg L^{-1} de ácido ascórbico, e por último, já dentro da câmara de fluxo laminar, em ambiente asséptico, foram aplicados os tratamentos. Após a imersão no hipoclorito de sódio, as gemas foram lavadas pelo menos três vezes com água destilada autoclavada e em seguida inoculadas no meio de cultura.

A fase de estabelecimento foi realizada em sala de crescimento com temperatura de $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$. Os explantes foram mantidos durante os 4 primeiros dias no escuro e em seguida em fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de $30 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Aos 30 dias, avaliaram-se as contaminações bacterianas (determinadas por avaliação visual da presença de bactérias no meio de cultura e/ou no explante), de explantes oxidados (determinados pela visualização de tecidos oxidados) e sobreviventes (determinados pela análise visual dos explantes sadios) cujos valores foram expressos em percentagem.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatorze tratamentos, cinco repetições e três gemas por repetição. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

5.3 Resultados e Discussão

Os resultados da análise de variância indicam que não houve diferença significativa para percentagem de contaminação bacteriana entre as diferentes variedades de figueira

($P > 0,05$). Entretanto, a análise foi significativa para as variáveis explantes oxidados e sobreviventes ($P < 0,05$) (Tabela 10).

Tabela 10. Quadrados médios das análises de variância e níveis de significância referentes à percentagem de explantes de diferentes variedades de figueira (*Ficus carica* L.) contaminados por bactérias, oxidados e sobreviventes. Ilha Solteira – SP, 2009.

Causa de variação	QUADRADOS MÉDIOS		
	Explantes		
	Contaminação bacteriana	Oxidação	Sobreviventes
Variedades	14,12 ^{ns}	351,86*	372,58*
CV (%)	56,79	68,74	9,73

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.
ns: não significativo.

Os resultados demonstraram o mesmo comportamento em relação ao controle da contaminação bacteriana entre as diferentes variedades, ocorrendo em média 10% de contaminação bacteriana (Tabela 11).

Tabela 11. Percentagem de explantes de diferentes variedades de figueira (*Ficus carica* L.) contaminados por bactérias, oxidados e sobreviventes. Ilha Solteira – SP, 2009.

Cultivares*	Explantes		
	Contaminação bacteriana (%)	Oxidados (%)	Sobreviventes (%)
White Adriatic	11 a	18 b	70 a
White Genoa	12 a	20 b	68 a
Pingo de mel IAC	11 a	4 a	84 b
Roxo de Valinhos IAC	12 a	2 a	85 b
Palestino	9 a	5 a	84 b
Pingo de mel Ilha Solteira	11 a	4 a	85 b
Black Portugal	12 a	6 a	81 b
Roxo de Valinhos seleção P 42	12 a	2 a	86 b
Roxo de Valinhos seleção P 48	13 a	1 a	86 b
Mission Monte Alto	11 a	0 a	89 b
Mini Figo Piracicaba	13 a	3 a	84 b
Brown Turkey Piracicaba	10 a	5 a	85 b
Mini Figo Pelotas	10 a	4 a	86 b
Troiano Adamantina	10 a	4 a	86 b

Valores seguidos por letras iguais na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Entretanto, pode-se observar que para as variáveis percentagens de explantes oxidados e sobreviventes, houve diferença significativa entre as variedades testadas, onde as variedades White Adriatic (T_1) e White Genoa (T_2) demonstraram maior percentagem de oxidação, em média 18 e 20% respectivamente, não diferindo entre si, e conseqüentemente menor taxa de

sobrevivência, em média 70 e 68%. As demais variedades testadas não tiveram diferença significativa entre si, para explantes oxidados e sobreviventes, com média de 85% de sobrevivência.

Os resultados obtidos no experimento demonstraram que as diferentes variedades possuem características genéticas próprias, que as fazem responderem diferentemente às condições de cultivo *in vitro*. Provavelmente as variedades White Adriatic (T1) e White Genoa (T2) possuem maior sensibilidade ao protocolo de assepsia e aos componentes presentes no meio nutritivo testados, ocasionando uma maior percentagem de explantes oxidados e conseqüentemente menor taxa de sobrevivência em relação as demais variedades testadas. Zimmerman (1983) afirma que há uma variação no comportamento das espécies lenhosas em relação as condições a que são submetidas na micropropagação, e por esta razão é necessário que esta técnica seja adaptada as necessidades dos diferentes genótipos.

Segundo Hu e Ferreira (1998) as respostas *in vitro* são regidas pela constituição genética, ou seja, o crescimento ótimo de um tecido *in vitro* pode variar de acordo com a espécie, entre a mesma espécie, e até mesmo na própria planta. Magalhães Júnior et al. (1995) citam que diferentes genótipos podem ter diferentes condições ótimas de crescimento, pré-tratamento, composição de meio de cultura e condições físicas de cultura.

Desta forma, observando-se a existência de diferenças genótípicas na resposta ao estabelecimento *in vitro*, com a implicação disto aos propósitos da micropropagação, verificou-se a necessidade de serem desenvolvidos protocolos específicos para cada variedade, o que também ocorre entre outras espécies, como já constatado por outros autores: Ganem, 2008 (banana), Barboza et al., 2004 (abacaxi), Brahm e Oliveira, 2004 (morango).

5.4 Conclusões

As variedades White Adriatic e White Genoa são susceptíveis as condições assépticas e ao meio nutritivo levando a maiores índices de oxidação e menor sobrevivência das gemas.

6 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS NUTRITIVOS NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE FIGUEIRA

Resumo

Em consequência as amplas possibilidades de produção e comercialização do figo tanto no mercado interno como externo, há necessidade de aperfeiçoamento das técnicas de plantio aliada a obtenção de mudas sadias isentas de patógenos, favorecendo a formação de frutos de qualidade. A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado sob condições de plena assepsia, em meio nutritivo artificial, e vêm sendo utilizadas com sucesso em diversos objetivos como a obtenção de mudas sadias em diversas espécies e como apoio a programas de melhoramento genético. Um fator importante para o estabelecimento *in vitro* é a escolha do meio de cultivo, devido ao importante papel dos componentes minerais no processo de regeneração dos explantes. O objetivo do trabalho foi verificar o meio de cultivo mais adequado para o estabelecimento *in vitro* de gemas apicais de figueira provenientes do campo. Foram utilizadas gemas apicais de figueira cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante. O experimento foi constituído pelos seguintes tratamentos: T₁ (½ MS), T₂ (MS), T₃ (½ WPM) e T₄ (WPM). Os explantes foram avaliados 60 dias após a incubação. Verificou-se a percentagem de gemas desenvolvidas, determinadas a partir da avaliação visual do aparecimento de folhas e gemas laterais. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knot a 5% de probabilidade. Os meios de cultura WPM e MS/2 proporcionaram a maior percentagem de gemas apicais de figueira crescidas.

Palavras chave: Meio de cultura. Micropropagação. *Ficus carica* L. Gema apical.

INFLUENCE OF DIFFERENT NUTRITIONAL MEANS *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF FIG TREE

Abstract

Consequently the vast possibilities of production and marketing Fig both domestically and externally, there is need for improvement of farming techniques coupled with getting healthy seedlings free from pathogens, favoring the formation of quality fruits. The plant tissue culture comprises a set of techniques in which an explant (cell, tissue or organ) is isolated and grown under full asepsis in artificial nutrient medium, and have been successfully used in several goals such as obtaining seedlings sound in several species and how to support the breeding programs. An important factor for establishing *in vitro* is the choice of medium, given the important role of mineral components in the process of regeneration of explants. The objective was to determine the most suitable culture medium for *in vitro* establishment of apical buds from the field of fig. Apical buds were fig cv. 'Purple Valinhos' Giant selection. The experiment comprised the following treatments: T1 ($\frac{1}{2}$ MS), T2 (MS), T3 ($\frac{1}{2}$ WPM) and T4 (WPM). The explants were evaluated 60 days after incubation. There was the percentage of buds developed, determined from visual examination of the emergence of leaves and lateral buds. The experimental design was randomized and treatments means were compared by Scott Knot test at 5% probability. The means of WPM and MS/2 provided the greatest proportion of apical buds grown fig.

Key words: Culture medium. Micropropagation. *Ficus carica* L. Apical bud.

6.1 Introdução

A figueira é cultivada comercialmente no Brasil desde o início do século passado, mais precisamente a partir de 1910, na cidade paulista de Valinhos. A cultura possui boas perspectivas de expansão, principalmente nos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais, devido ao crescente interesse na produção de figos para a industrialização (NORBERTO et al., 2001). No Brasil, o cultivo da figueira baseia-se praticamente na plantação de um único cultivar, o Roxo de Valinhos, caracterizado pelo seu elevado vigor e produtividade (FRÁGUAS, 2003).

Segundo Fráguas (2003) em consequência as amplas possibilidades de produção e comercialização do figo tanto no mercado interno como externo, há necessidade de aperfeiçoamento das técnicas de plantio aliada a obtenção de mudas sadias isentas de patógenos, favorecendo a formação de frutos de qualidade.

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado sob condições de plena assepsia, em meio nutritivo artificial, e vêm sendo utilizadas com sucesso em diversos objetivos como a obtenção de mudas sadias em diversas espécies e como apoio a programas de melhoramento genético (CALDAS et al., 1998).

Um fator importante para o estabelecimento *in vitro* é a escolha do meio de cultura, um fator relevante para a micropropagação, devido ao importante papel dos componentes minerais no processo de regeneração dos explantes (RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

Para o sucesso da micropropagação o meio nutritivo deve suprir os tecidos e ou órgãos cultivados *in vitro* com nutrientes necessários ao crescimento como sais minerais e carboidratos (FERREIRA, 2006). Entre os meios mais utilizados destaca-se o MS, desenvolvido por Murashigue e Skoog (1962), caracterizado por proporcionar melhor crescimento de células e tecidos devido à alta concentração de sais presentes neste meio. Outro meio muito utilizado é o WPM formulado por Lloyd e McCown (1980) que foi desenvolvido para cultura de brotações em plantas lenhosas, com $\frac{1}{4}$ das concentrações de NO_3^- e NH_4^+ do meio MS, além de possuir mais potássio e um alto nível de íons sulfato (PASQUAL, 2001). Entretanto, para cada tipo de espécie, cultivar e explante, o meio mais adequado e eficiente é variável, sendo assim, para determinar qual o melhor meio de cultura deve-se realizar diversos ensaios (BRUM, 2001).

Autores com Kumar et al. (1998), Barbosa et al. (1992), Brum (2001) e Ferreira (2006) já constataram a importância do meio nutritivo para micropropagação da figueira, mas

são escassos os trabalhos realizados em relação a influência do meio de cultura no estabelecimento *in vitro* de figueira por meio de gemas apicais provenientes de plantas adultas.

Objetivou-se verificar o meio de cultura mais adequado para o estabelecimento *in vitro* de gemas apicais de figueira provenientes do campo.

6.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido em julho de 2009 no Laboratório de Biotecnologia da à Faculdade de Engenharia da UNESP *Campus* de Ilha Solteira – SP. Foram utilizadas gemas apicais de figueira cv. ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante, procedentes da coleção do campo experimental da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da Faculdade de Engenharia da UNESP, localizada em Selvíria – MS (20°20’28.96” de latitude Sul e 51°24’08.66” de longitude Oeste com altitude média de 367 m). As plantas mantidas na coleção receberam os tratamentos culturais, foram adubadas e irrigadas de acordo com Rodrigues et al., 2009.

No campo, os ápices caulinares foram coletados, com aproximadamente 10 cm de comprimento, com o auxílio de tesoura, e armazenados em recipientes com água até cobrir todo o material coletado. No laboratório os ápices caulinares foram mantidos em recipiente com água corrente e 10 gotas de detergente neutro durante trinta minutos. Após a lavagem em água corrente as gemas apicais foram seccionadas com bisturi esterilizado permitindo assim a redução de seu tamanho a aproximadamente 1 cm de comprimento para posteriores tratamentos de assepsia realizados nos experimentos.

O experimento foi constituído pelos seguintes tratamentos: T₁ (½ MS), T₂ (MS), T₃ (½ WPM) e T₄ (WPM) (Murashige e Skoog, 1962; Lloyd e McCown, 1980 – Tabela 12). Todos os tratamentos foram suplementado com 200 mg L⁻¹ de ampicilina sódica, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1 esterilizados por autoclavagem (121 °C com 1, 05 kgf cm⁻², por vinte minutos). A ampicilina sódica foi adicionada ao meio de cultura após a autoclavagem, dentro da câmara de fluxo laminar.

Antes da montagem do experimento foram feitos testes pilotos (dados não apresentados) para a assepsia com as gemas apicais de figueira já seccionadas, e com base nestes foi estabelecido um pré-tratamento, onde fora da câmara de fluxo laminar, os explantes foram: 1°) imersos em etanol 70% durante 1 minuto, lavados 3 vezes com água destilada autoclavada; 2°) imersos em uma solução de 2 g L⁻¹ de methiltiofan (fungicida) + 250 mg L⁻¹

de cloranfenicol (antibiótico) durante 5 minutos e lavados 3 vezes com água destilada autoclavada; 3°) na sequência os explantes foram imersos durante 5 minutos em 250 mg L⁻¹ de ácido cítrico + 250 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, e por último, já dentro da câmara de fluxo laminar, em ambiente asséptico, foram aplicados os tratamentos. Após a imersão no hipoclorito de sódio, as gemas foram lavadas pelo menos três vezes com água destilada autoclavada e em seguida inoculadas no meio de cultura.

Tabela 12. Composição dos meios nutritivos MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), ½ MS, ½ WPM e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981)*.

	½ MS (mg L ⁻¹)	MS (mg L ⁻¹)	½ WPM (mg L ⁻¹)	WPM (mg L ⁻¹)
Macronutrientes				
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	278,000	556,000
NH ₄ NO ₃	825,000	1.650,000	200,000	400,000
KNO ₃	950,000	1.900,000	-	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	220,000	440,00	48,000	96,000
MgSO ₄ .7H ₂ O	185,000	370,00	185,000	370,00
KH ₂ PO ₄	85,000	170,00	85,000	170,00
K ₂ SO ₄	-	-	-	-
Micronutrientes				
MnSO ₄ .4H ₂ O	11,150	22,300	11,1500	22,300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4,300	8,600	4,300	8,600
H ₃ BO ₃	3,100	6,200	3,100	6,200
KI	0,415	0,830	-	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,125	0,250	0,125	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,012	0,025	0,012	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,012	0,025	-	-
Ferro-EDTA				
Na ₂ EDTA	18,620	37,250	18,620	37,250
FeSO ₄ .7H ₂ O	13,925	27,850	13,925	27,850
Vitaminas				
Tiamina - HCl	0,050	0,100	0,050	0,100
Piridoxina - HCl	0,250	0,500	0,250	0,500
Ac. Nicotínico	0,250	0,500	0,250	0,500
Glicina	1,000	2,000	1,000	2,000

* Dados adaptados de Xavier et al., (2007).

A fase de estabelecimento foi realizada em sala de crescimento com temperatura de 22 ± 3 °C. Os explantes foram mantidos durante os 4 primeiros dias no escuro e em seguida em fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹.

Os explantes foram avaliados 60 dias após a incubação por meio das características de gemas crescidas, determinadas a partir da avaliação visual do aparecimento de folhas e gemas laterais.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos, cinco repetições e dez tubos por repetição. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott Knot a 5% de probabilidade.

6.3 Resultados e Discussão

De acordo com a análise de variância, pode-se observar que houve diferença significativa entre os diferentes meios de cultura utilizados para o estabelecimento *in vitro* das gemas apicais de figueira ($P < 0.05$) (Tabela 13).

Tabela 13. Quadrados médios das análises de variância e níveis de significância referentes à percentagem de explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv. ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante crescidos *in vitro*. Ilha Solteira – SP, 2009.

Causa de variação	QUADRADO MÉDIO
	Explantes Desenvolvidos
Meios de cultura	1353,33*
CV (%)	18,40

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

As maiores percentagens de gemas crescidas ocorreram nos tratamentos com o meio de cultura WPM (100% dos sais e vitaminas) e o meio MS/2 (50% dos sais e vitaminas) (Figura 10), com médias de gemas crescidas de 72 e 68% respectivamente. Os tratamentos WPM/2 (50% dos sais e vitaminas) e MS (100% dos sais e vitaminas) tiveram as menores percentagens de gemas desenvolvidas, com médias de 36 e 52% respectivamente, não diferindo entre si.

Vários autores têm relatado a possibilidade de reduzir a concentração de sais do meio MS, para diversas espécies, visando ao melhor desenvolvimento das plantas e redução nos custos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; BRUM, 2001). Paiva et al. (1997a) utilizaram 50% dos sais do meio MS obtendo um bom desenvolvimento *in vitro* de gloxínia.

Tabela 14. Percentagem média de gemas apicais de figueira (*Ficus carica* L.) cv. ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante crescidas após a incubação em diferentes meios de cultura. Ilha Solteira – SP, 2009.

Tratamentos (Diferentes meios de cultura)	Média de gemas apicais Desenvolvidas (%)
MS/2	68 a
MS	52 b
WPM/2	36 c
WPM	72 a

Valores seguidos por letras iguais na vertical, não diferem entre si pelo teste de Scott Knot a 5% de probabilidade.

Segundo Saadat e Hennerty (2002), os meios de cultura utilizados nos estágios de estabelecimento da cultura e multiplicação são similares, pois ambos possuem em suas formulações macronutrientes, micronutrientes, carboidratos, geralmente a sacarose, e alguns compostos orgânicos como vitaminas e aminoácidos. Entretanto, o meio de cultura WPM possui menores concentrações de sais (especialmente nitrogênio e potássio) quando comparado ao meio MS, o qual contém altas concentrações de sais, sobretudo os íons nitrato e amônio. De acordo com Harry e Thorpe (1994) geralmente o meio WPM é mais eficiente em espécies lenhosas quando o meio MS não for eficiente.

Em estudos realizados por Coelho et al. (2001) com Sucupira Branca (*Peterodon pubescens* Benth), segmentos nodais foram mais bem estabelecidos em meio WPM, quando comparados com o meio MS. Silva et al. (2006) verificou que brotações de Mirtilo cv. Delite (*Vaccinium ashei* Reade) atingiram maior tamanho quando cultivados em meio WPM e Rezende et al. (2008) constatou que o meio WPM foi mais eficiente para o desenvolvimento de plântulas de cafeeiro.

Fráguas (2003) testou diferentes concentrações do meio WPM (50, 100 e 200%) na multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* “Roxo de Valinhos”, observando que concentração padrão do WPM (100%) foi a mais eficiente para o desenvolvimento dos explantes. De acordo com a autora, plantas lenhosas usadas na micropropagação podem ser afetadas pela presença excessiva de componentes do meio nutritivo que conduzem a desordem metabólica e morfológica. Algumas espécies, quando cultivadas *in vitro* são suscetíveis a uma reação de hipersensibilidade às condições de estresse do meio, desenvolvendo variações anormais como a vitrificação, assinalada por desordens fisiológicas generalizadas, comum em algumas espécies de plantas lenhosas onde ocorre a adição de altas concentrações de íons ao meio de cultura, podendo em casos extremos levar à morte da cultura (ZIMMERMAN, 1984).

6.4 Conclusões

Os meios de cultura WPM e MS/2 proporcionaram a maior percentagem de gemas apicais de figueira crescidas

7 MULTIPLICAÇÃO E ALONGAMENTO *IN VITRO* DE FIGUEIRA

Resumo

Um dos objetivos da micropropagação é a maximização da multiplicação de gemas. Assim, muita atenção para sua obtenção tem sido dada através da manipulação das substâncias de crescimento adicionadas ao meio de cultura. Com o presente trabalho objetivou-se avaliar o efeito de concentrações de benzilaminopurina (BAP) e ácido giberélico (GA_3) na multiplicação e alongamento *in vitro* de figueira (*Ficus carica* L.) cultivar “Roxo de Valinhos” seleção Gigante. Os experimentos foram realizados em duas fases: A fase 1 na qual foi testada a multiplicação *in vitro* dos explantes de figueira inoculados em meio de cultura WPM com 100% dos sais, inositol e vitaminas, 20 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ BAP); A fase 2 na qual foi testado o alongamento *in vitro* das brotações de figueira inoculadas em meio de cultura WPM com 100% dos sais, inositol, vitaminas, 2 mg L⁻¹ de BAP, 20 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações de GA_3 (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ GA_3). Nas duas fases, após 60 dias, as variáveis avaliadas foram o número e comprimento médio de brotações e comprimento médio das brotações. Concluiu-se que a citocinina BAP adicionada ao meio de cultura, entre as concentrações de 2 a 4 mg L⁻¹, aumenta o número de brotações em explantes de figueira e que o GA_3 alonga as brotações de figueira multiplicadas *in vitro*, mas em altas concentrações causa clorose, vitrificação e com necrose apical nas brotações.

Palavras chave: *Ficus carica* L. Micropropagação. Citocinina. Ácido giberélico.

MULTIPLICATION AND ELONGATION *IN VITRO* FIG TREE

Abstract

One goal of micropropagation is to maximize the bud multiplication. So much attention for its acquisition has been given through the manipulation of growth substances added to the culture medium. The present study aimed to evaluate the effect of different concentrations of benzylaminopurine (BAP) and gibberellic acid (GA₃) on the multiplication and elongation *in vitro* (*Ficus carica* L.) cultivar "Purple Valinhos" Giant selection. The experiments were conducted in two phases: Phase 1 in which it was tested *in vitro* propagation of explants inoculated in fig WPM with 100% of salts, vitamins and inositol, 20 g L⁻¹ sucrose and 7 g L⁻¹ agar and various concentrations of BAP (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg L⁻¹ BAP) Phase 2 which was tested *in vitro* elongation of shoots fig inoculated in WPM with 100% of salts, inositol, vitamins, 2 mg L⁻¹ BAP, 20 g L⁻¹ sucrose and 7 g L⁻¹ agar and different concentrations of GA₃ (0.0; 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 mg L⁻¹ GA₃). In both phases, after 60 days, the variables were the number and average length of shoots and average length of shoots. We conclude that the BAP added to the culture medium, concentrations between 2-4 mg L⁻¹, increases the number of shoots in explants and that the fig GA₃ lengthen fig shoots multiplied *in vitro*, but at high concentrations causes chlorosis, vitrification and apical necrosis in shoots.

Key words: *Ficus carica* L. Micropropagation. Cytokinin. Gibberellic acid

7.1 Introdução

Devido as suas características de rusticidade e adaptabilidade às diversas condições climáticas a cultura da figueira (*Ficus carica* L.) vem apresentando grande expansão mundial. Muito cultivada no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste, essa frutífera encontra adequada adaptação às condições climáticas de invernos amenos e verões quentes e úmidos (CHALFUN et al., 1997).

No Brasil a cultivar “Roxo de Valinhos” é a única plantada comercialmente e, mesmo sendo apreciada pelos produtores principalmente pela sua rusticidade, alta produtividade e elevado vigor, tem problemas fitossanitários importantes, como nematóides, o vírus do mosaico, entre outros. De acordo com Ferreira (2006) estes patógenos estão presentes em grande parte dos plantios comerciais e, aliados a propagação vegetativa, pelo método de estaquia, que contribuem para a disseminação dos mesmos, agravando a situação.

Diante do problema e considerando a expansão comercial do fruto, tanto para o mercado interno como externo, verifica-se a necessidade de aprimorar as técnicas de plantio, bem como a produção de mudas sadias livres de qualquer patógeno. Estas dificuldades podem ser superadas com a cultura de tecidos, através da micropropagação, com a qual é possível se conseguir um grande número de mudas sadias e livres de pragas, num curto espaço de tempo.

Um dos objetivos da micropropagação é a maximização da multiplicação de gemas. Assim, muita atenção para sua obtenção tem sido dada através da manipulação das substâncias de crescimento adicionadas ao meio de cultura (VILLA et al., 2005).

O crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e balanço dos reguladores de crescimento existentes no meio de cultura, principalmente auxinas e citocininas (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

As citocininas são utilizadas para quebra da dominância apical dos brotos e aumento da taxa de multiplicação. Desse modo, ocorre um grande número de brotações por meio do crescimento de meristemas laterais (SRISKANDARAJAH et al., 1982).

Entre as citocininas o BAP (benzilaminopurina) tem sido muito eficiente na multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diversas espécies (HU e WANG, 1983). Para multiplicação em meio de cultura, em geral, suas concentrações variam de 0,1 a 5 mg L⁻¹ (TOMBOLATO; COSTA, 1998). Nobre et al. (1998) observaram bons resultados quanto a taxa de multiplicação da figueira, cultivares ‘Berbera’ e ‘Lampa (5,3 brotos/explante) utilizando 0,5 mg L⁻¹ de BAP.

Brotações multiplicadas que tem pequeno comprimento podem ter baixo percentual de enraizamento ou dar origem a mudas de baixa qualidade para a fase de aclimatização (SILVA, 2004). As giberilinas têm como principais efeitos o alongamento das brotações durante a multiplicação *in vitro* e variam conforme a interação existente com outros reguladores de crescimento, dependendo da espécie propagada *in vitro* (GEORGE, 1996). Em ensaios com meristemas de figueira, das cultivares ‘Bursa Siyahi e Alkuden’, Songul et al. (2005) concluíram que 0,2 mg L⁻¹ de GA₃ e 0,5 mgL⁻¹ de BAP promoveram maior sobrevivência dos meristemas e que 0,2 mgL⁻¹ de GA₃ e 2,0 mg L⁻¹ de BAP propiciaram maior formação de raízes.

Com o presente trabalho objetivou-se verificar o efeito de concentrações de benzilaminopurina (BAP) e ácido giberélico (GA₃) na multiplicação e alongamento *in vitro* de figueira.

7.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido em setembro de 2009 no Laboratório de Biotecnologia pertencente à Faculdade de Engenharia da UNESP Campus de Ilha Solteira – SP. Os explantes são originários de gemas apicais, de plantas matrizes cultivadas no campo, da cv. Roxo de Valinhos, seleção Gigante.

Fase 1) Multiplicação *in vitro*:

Foram utilizados segmentos caulinares com aproximadamente 15 mm de comprimento, provenientes do processo de estabelecimento *in vitro* da cv. Roxo de Valinhos, seleção Gigante. Os explantes foram inoculados em meio de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1980) com 100% dos sais, inositol, vitaminas, 20 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ BAP), com pH ajustado para 5,7 ± 0,1 e esterilizado por autoclavagem (121 °C com 1, 05 kgf cm⁻², por vinte minutos). Foram utilizados 30 mL do meio em cada frasco e após a inoculação, os explantes permaneceram em sala de crescimento com temperatura de 22 ± 3 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹.

Após 60 dias, as variáveis avaliadas foram o número médio de brotações e comprimento médio das brotações. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos, cinco repetições e três frascos por repetição com quatro explantes por frasco. As médias dos tratamentos foram comparadas por meio de regressão polinomial.

Fase 2) Alongamento *in vitro* das brotações:

Nesta fase dos experimentos foram utilizadas as brotações de figueira provenientes do meio de multiplicação. As brotações com aproximadamente 6 mm de comprimento foram cultivadas em meio de cultura WPM (Lloyd e Mccown, 1980) com 100% dos sais, inositol, vitaminas, 2 mg L⁻¹ de BAP e 20 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar suplementado com ácido giberélico (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ GA₃), com pH ajustado para 5,7 ± 0,1 e esterilizado por autoclavagem (121 °C com 1,05 kgf cm⁻², por vinte minutos). Foram utilizados 15 mL do meio em cada tubo de ensaio e após a inoculação, os explantes permaneceram em sala de crescimento com temperatura de 22 ± 3 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹.

Após 60 dias, a variável avaliada foi o comprimento médio das brotações. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, contendo cinco repetições, oito tubos por repetição explantes por tubo. As médias dos tratamentos foram comparadas por meio de regressão polinomial e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

7.3 Resultados e Discussão**Fase 1) Multiplicação *in vitro*:**

Para o número médio de brotações por explante, foi verificada uma tendência de aumento na produção de brotações com o aumento das doses BAP adicionadas ao meio de cultura. Assim, a máxima produção de brotações foi alcançada pela adição de 2 e 4 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultura (Figura 08).

Este resultado concorda com Brum et al. (2002) que testando diferentes doses dos reguladores BAP e NAA na multiplicação de figueira, observou que os melhores resultados para indução de brotações ocorre nas doses 2 a 4 mg L⁻¹ de BAP sem a adição de NAA.

Segundo Rocha et al. (2009) novas brotações formadas por explante como no presente trabalho, estão relacionadas com o aumento da concentração de BAP no meio de multiplicação, pois a citocinina (BAP) é responsável pelo aumento da divisão celular.

Verificou-se que as novas brotações formadas *in vitro* desenvolveram-se a partir das gemas axilares existentes no explante inoculado. Observou-se também que os explantes cultivados na ausência de BAP não multiplicaram, demonstrando assim uma dependência pela adição de citocininas para a indução de brotações.

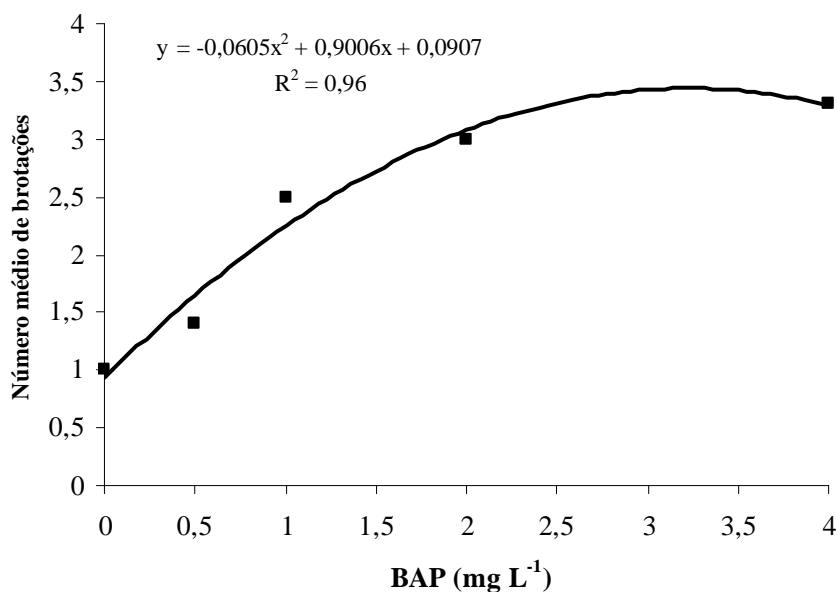


Figura 08. Número médio de brotações de figueira (*Ficus carica* L.) cv 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante, cultivadas em meio de cultura com diferentes concentrações de BAP. Ilha Solteira – SP, 2009.

De acordo com Pasqual (2001) é indispensável a utilização de uma fonte de citocinina adicionada ao meio de cultura durante a multiplicação para promover a quebra da dominância apical do explante e induzir a proliferação das gemas axilares. Fráguas et al. (2004) também verificaram a necessidade da utilização de uma fonte citocinina durante a multiplicação *in vitro* de explantes de figueira da cv. Roxo de Valinhos. Em relação ao comprimento médio das brotações, observou-se que com o aumento das doses de BAP houve um decréscimo no comprimento das brotações (Figura 09 e 10).

De acordo com Pasqual (2001) altas taxas de citocininas podem reduzir o tamanho das brotações e estimular a hiperidricidade e formação de folhas anormais, o que foi observado durante o presente trabalho.

Os dados observados concordam com os obtidos por Fráguas (2003) em explantes de figueira da cv. 'Roxo de Valinhos', onde com o aumento das concentrações até 2 mg L⁻¹ de BAP, houve queda acentuada no tamanho dos brotos, a partir do qual o comprimento tendeu a estabilização. A autora relata que é possível que tenha ocorrido um desbalanço hormonal em resposta a elevação das concentrações de citocinina.

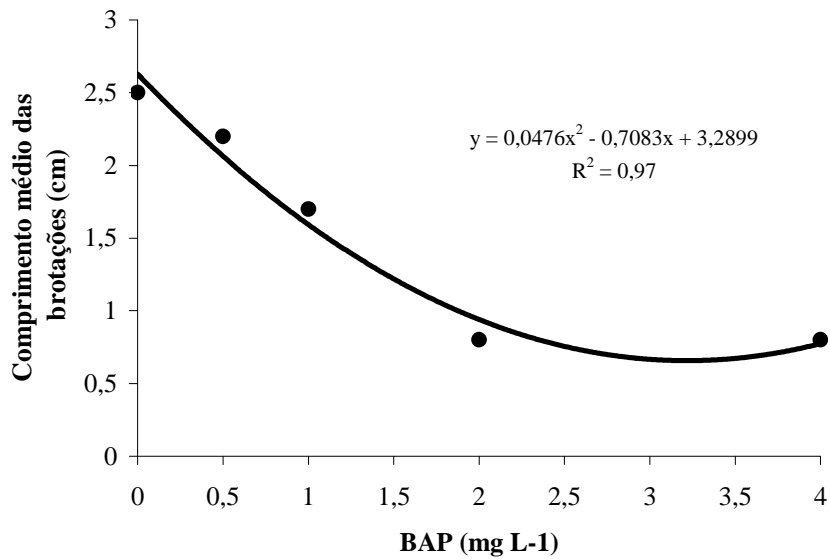


Figura 09. Comprimento médio das brotações em explantes de figueira (*Ficus carica* L.) cv ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante, cultivadas em meio de cultura com diferentes concentrações de BAP. Ilha Solteira – SP, 2009.



Figura 10. Brotações de figueira (*Ficus carica* L.) cv ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante com adição de 2 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultura. Ilha Solteira – SP, 2009.

Diversos autores relatam o efeito das citocininas sobre a quebra da dominância apical e o favorecimento da emissão das novas brotações, mas que em contrapartida são observados também efeitos na inibição do alongamento em virtude do acúmulo destes reguladores nos tecidos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990; DINIZ et al., 2004).

Fase 2) Alongamento *in vitro* das brotações:

Observou-se que as diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃) adicionadas contribuíram para o alongamento *in vitro* dos segmentos nodais de figueira até a concentração de 2 mg L⁻¹ de GA₃ (Figura 11).

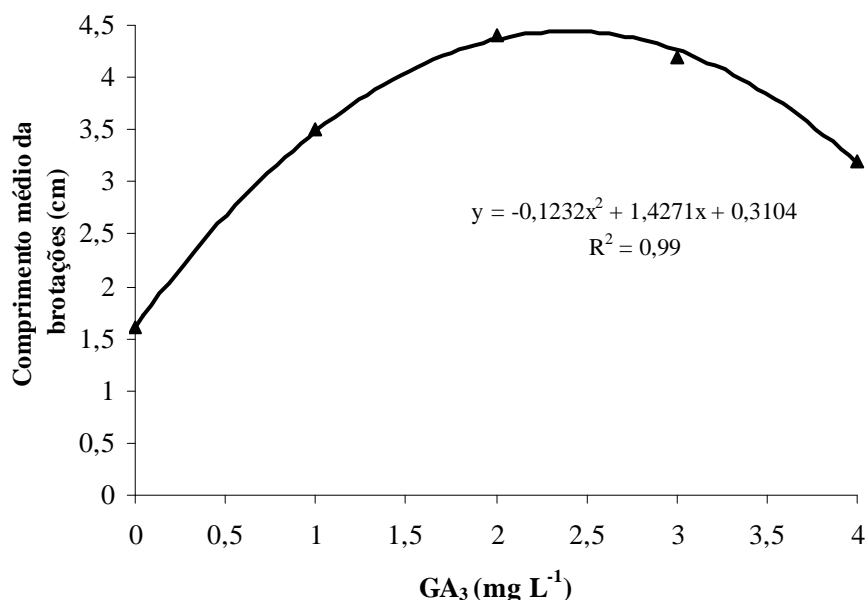


Figura 11. Comprimento médio de brotações de figueira (*Ficus carica* L.) cv 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante, cultivadas em meio de cultura com diferentes concentrações de GA₃. Ilha Solteira – SP, 2009.

Constatou-se que na maior concentração de GA₃ 4 mg L⁻¹ as brotações estavam cloróticas, vitrificadas e com necrose apical (Figura 15). As mesmas características foram observadas por Fráguas (2003) em brotações de figueira da cv. 'Roxo de Valinhos' com a adição de concentrações elevadas de GA₃.

Em relação ao número médio de brotações, nenhum efeito significativo do acréscimo de ácido giberélico (GA₃) no meio de cultura foi significativo (Tabela 15). Demonstrando que o ácido giberélico possui influência no aumento do comprimento das brotações, devido ao estímulo da divisão e alongamento das células (ROCHA et al., 2009).

Tabela 15. Valores médios para o número médio de brotações de figueira (*Ficus carica* L.) cv ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante, cultivadas em meio de cultura com diferentes concentrações de GA₃. Ilha Solteira – SP, 2009.

Tratamento (mg L ⁻¹ GA ₃)	Número médio de brotações
0,0	3,3 a
0,5	3,1 a
1,0	3,1 a
2,0	3,2 a
4,0	3,0 a

Valores seguidos por letras iguais na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Segundo Mantovani et al. (2001) a presença de 1 mg L⁻¹ GA₃ no meio de cultura promoveu um melhor desenvolvimento dos eixos caulinares e das folhas em brotações de louro-pardo (*Cordia trichotoma*), o que tornou mais fácil a individualização, aproveitamento e contagem dessas brotações. Segundo Debergh e Read (1991) as giberilinas têm ação no alongamento celular, provocando o alongamento dos eixos caulinares e a redução dos efeitos residuais das citocininas.

7.4 Conclusões

A citocinina benzilaminopurina (BAP) adicionada ao meio de cultura, entre as concentrações de 2 a 4 mg L⁻¹, aumentou o número de brotações em explantes de figueira.

O ácido giberélico (GA₃) alongou as brotações de figueira multiplicadas *in vitro*, mas em altas concentrações causa clorose, vitrificação e com necrose apical nas brotações.

8 EFEITO DO FLOROGLUCINOL SOBRE O ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE FIGUEIRA

Resumo

O propósito da rizogênese é a formação de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas após o estágio de multiplicação, que permite a constituição de plantas completas, para posterior aclimação às condições *ex vitro*. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do AIB e do floroglucinol no enraizamento *in vitro* de figueira (*Ficus carica* L.) cultivar “Roxo de Valinhos” seleção Gigante. O experimento foi conduzido em laboratório, onde foram utilizadas brotações com dois pares de folhas da cv. Roxo de Valinhos, seleção Gigante, provenientes do processo de multiplicação *in vitro*. Os explantes são originários de gemas apicais, de plantas matrizes cultivadas no campo. O meio de cultura utilizado para o experimento de enraizamento foi o WPM com 100% dos sais, inositol, vitaminas, 20 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. A esse meio de cultura adicionou-se ainda 5 mg L⁻¹ IBA (ácido indobutírico) como indicado por Barbosa et al. (2008) e diferentes concentrações de floroglucinol (0; 100; 200 e 300 mg L⁻¹). A variável percentagem de enraizamento foi avaliada no 10°, 20°, 30° e 40° dias após a inoculação e as variáveis número e comprimento de raízes foram avaliadas no 30° dia após a inoculação. Conclui-se que o floroglucinol é eficiente para o enraizamento adventício de microestacas de figueira.

Palavras chave: *Ficus carliaca* L. Rizogênese. Micropropagação. Citocinina.

EFFECT OF THE FLOROGLUCINOL ON ROOTING IN VITRO OF FIG TREE

Abstract

The purpose of rooting is the formation of adventitious roots on shoots obtained after the stage of propagation, which allows the formation of complete plants for subsequent acclimation ex vitro conditions. This study aimed to evaluate the effect of IBA and phloroglucinol in vitro rooting of fig (*Ficus carica* L.) cultivar "Purple Valinhos" Giant selection. The experiment was conducted in laboratory, were used to shoot two pairs of leaves of cv. Purple Valinhos, Giant selection, from the multiplication process in vitro. The explants are from apical buds from mother plants grown in the field. The culture medium used for rooting experiment was WPM with 100% of salts, inositol, vitamins, 20 g L⁻¹ sucrose and 7 g L⁻¹ agar. In this culture medium was also added 5 mg L⁻¹ IBA (indobutírico acid) as described by Barbosa et al. (2008) and different concentrations of phloroglucinol (0, 100, 200 and 300 mg L⁻¹). The variable percentage of rooting was evaluated 10°, 20°, 30° and 40° days after inoculation and the variables number and length of roots were evaluated on day 30 after inoculation. We conclude that phloroglucinol and efficient for adventitious rooting microcuttings fig.

Key words: *Ficus carica* L. Rizogênez. Micropropagation. Cytokinin.

8.1 Introdução

A micropropagação da figueira pode ser considerada uma técnica eficiente para a obtenção de mudas sadias, em grande quantidade e em curto espaço de tempo. No Brasil, algumas pesquisas foram desenvolvidas objetivando obter protocolos para crescimento e enraizamento *in vitro* de plantas de figueira (FERREIRA, 2006; FRÁGUAS, 2003; BRUM, 2001; SOBRINHO et al., 1998; BARBOSA et al., 1992). Segundo Barbosa et al (2008) mesmo com o sucesso obtido, nos diversos protocolos anteriormente desenvolvidos, muitos aspectos precisam ainda ser pesquisados, entre eles: descontaminação de explantes, reversão de juvenilidade, eficiência rizogênica e comportamento das figueiras micropropagadas no campo.

O propósito da rizogênese é a formação de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas após o estágio de multiplicação, que permite a constituição de plantas completas, para posterior aclimação às condições *ex vitro*. No caso da maioria das espécies lenhosas, o enraizamento é a etapa mais difícil, principalmente quando se usa material na fase adulta (HU; WANG, 1983). O processo de enraizamento é muito complexo, incluindo fatores fisiológicos, bioquímicos e biológicos (fatores internos) que interagem com os fatores externos. Além disso, a complexidade é aumentada pela variabilidade genética devido à multiplicidade das espécies e cultivares (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

O controle do desenvolvimento de raízes adventícias é influenciado por substâncias reguladoras de crescimento. As auxinas são os reguladores de crescimento que aumentam a formação de primórdios radiculares (TAIZ; ZEIGER, 2009). Auxinas são substâncias quimicamente relacionadas com o ácido indolacético (IAA), que é a auxina principal de várias plantas. Essas substâncias têm em comum a capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular em cultura de tecidos, principalmente no enraizamento (KRIKORIAN, 1991). O papel das auxinas na indução e no desenvolvimento de raízes tem sido bastante pesquisado, sendo que o ácido indolbutírico (IBA) é o mais utilizado, por possibilitar boa capacidade de enraizamento e ser menos sensível à degradação biológica, em comparação às demais auxinas sintéticas (FACHINELLO et al., 2005).

O floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenzeno) é um composto fenólico que ocorre naturalmente em algumas espécies, pela degradação enzimática do floridizim glicosídeo, conhecido como um cofator de enraizamento adventício. Este tem sido amplamente utilizado para o enraizamento *in vitro* (ZANOL et al, 1998). De acordo com Debergh e Read (1991),

um grupo especial de compostos fenólicos são protetores das auxinas, pois atuam como antioxidantes, inibindo a oxidação destas. Segundo Jones e Hatfield (1976), a adição ao meio de cultura de compostos fenólicos como o floroglucinol juntamente com auxinas, elevam a percentagem de enraizamento e, para Schimildt et al. (2000) o floroglucinol promoveu o enraizamento de brotações de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv. Pêra. Zanol et al. (1998) relatam que a presença do floroglucinol acelerou a emergência das raízes, tendo o máximo de enraizamento aos 10 dias de incubação.

O presente trabalho teve por objetivo verificar o efeito do floroglucinol no enraizamento *in vitro* de figueira.

8.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido em novembro de 2009 no Laboratório de Biotecnologia pertencente à Faculdade de Engenharia da UNESP Campus de Ilha Solteira – SP. Foram utilizadas microestacas que se consistiram de brotações com dois pares de folhas da cv. Roxo de Valinhos, seleção Gigante, provenientes do processo de multiplicação *in vitro*. Os explantes são originários de gemas apicais, de plantas matrizes cultivadas no campo.

O meio de cultura utilizado para o experimento de enraizamento foi o WPM (Lloyd e McCown, 1980) com 100% dos sais, inositol, vitaminas, 20 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1 pH e esterilizado por autoclavagem (121 °C com 1, 05 kgf cm⁻², por vinte minutos). A esse meio de cultura adicionou-se ainda 5 mg L⁻¹ IBA (ácido indobutírico) como indicado por Barbosa et al. (2008) e diferentes concentrações de floroglucinol (0; 100; 200 e 300 mg L⁻¹). Após a inoculação, os explantes permaneceram em sala de crescimento com temperatura de 22 ± 3 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹ utilizados 15 mL do meio por tubo de ensaio e após a inoculação os explantes permaneceram em fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹.

A variável percentagem de enraizamento foi avaliada 10, 20, 30 e 40 dias após a inoculação e as variáveis número e comprimento de raízes foram avaliadas 30 dias após a inoculação. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, contendo quatro tratamentos com cinco repetições e seis tubos por repetição. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

8.3 Resultados e Discussão

Observou-se efeito significativo ($P < 0,005$) com base nos resultados da análise de variância referente a variável percentagem de enraizamento (Tabela 16), número de raízes e comprimento de raízes (cm) (Tabela 17)

Tabela 16. Quadrado médio da análise de variância e nível de significância referente à percentagem enraizamento *in vitro* em microestacas de figueira (*Ficus carica* L.) cv ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante. Ilha Solteira - SP, 2009.

Causa de variação	QUADRADO MÉDIO
	Percentagem de Enraizamento
Doses de floroglucinol X	367,7*
Dias de avaliação CV (%)	12,1

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 17. Quadrados médios da análise de variância e níveis de significância referente à número de raízes e comprimento de raízes (cm) em microestacas de figueira (*Ficus carica* L.) cv ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante. Ilha Solteira - SP, 2009.

Causa de variação	QUADRADOS MÉDIOS	
	Explantos	
	Número de raízes	Comprimento de raízes
Doses de floroglucinol	926,0*	571,9*
CV (%)	14,6	16,3

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

O floroglucinol adicionado ao meio de cultura juntamente com 5 mg L^{-1} de IBA aumentou a percentagem de enraizamento (Figura 12).



Figura12. Brotação de figueira (*Ficus carica* L.) cv 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante enraizada *in vitro* com adição de floroglucinol ao meio de cultura. Ilha Solteira – SP, 2009.

A ausência, assim como as concentrações mais baixas de floroglucinol reduziu significativamente o enraizamento (Tabela 18).

Tabela 18. Percentagem de enraizamento em microestacas de figueira (*Ficus carica* L.) cv 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante, tratadas com diferentes concentrações de floroglucinol após 10, 20, 30 e 40 dias de inoculação *in vitro*. Ilha Solteira – SP, 2009.

Dias após a inoculação	Floroglucinol (mg L ⁻¹)			
	0,0	100	200	300
% Enraizamento				
10	00,0 aC	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB
20	57,1 cB	88,4 bA	94,5 aA	94,7 aA
30	80,3 bA	90,5 aA	95,8 aA	95,5 aA
40	80,3 bA	90,5 aA	95,8 aA	95,5 aA

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Letras maiúsculas na vertical e letras minúsculas na horizontal).

As maiores percentagens de enraizamento (acima de 90%) foram obtidas após 20 dias de inoculação com 200 mg L⁻¹ de floroglucinol e após 30 dias com 100 mg L⁻¹ de floroglucinol adicionados ao meio de cultura (Tabela 19).

Barbosa et al. (2008) verificaram que aos 50 dias a maior percentagem de enraizamento para cultivar "Roxo de Valinhos" foi de 78,72%, quando submetido a 5 mg L⁻¹ de IBA e que o número médio de raízes foi de 3,5. Entretanto, na avaliação do presente trabalho observou-se que após 20 dias, com a adição de 200 m L⁻¹ de floroglucinol juntamente

com 5 mg L⁻¹ de IBA, a percentagem média de enraizamento foi de 94,5% (Tabela 18) e que após 30 dias com a mesma dose de floroglucinol o número médio de raízes foi 7,69 e que a medida que aumentou-se o número de raízes o comprimento destas diminuiu (Tabela 19).

Tabela 19. Número e comprimento de raízes de microestacas figueira (*Ficus carica* L.) cv ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante *in vitro*, após 30 dias de inoculação, tratadas com floroglucinol. Iha Solteira – SP, 2009.

Floroglucinol (mg L ⁻¹)	Número de raízes	Comprimento de raízes (cm)
0	3,28 c	2,34 a
100	5,47 b	2,15 a
200	7,69 a	1,41 b
300	8,01 a	1,28 b

*significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Valores seguidos por letras iguais na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A mesma tendência foi observada no trabalho Zanol et al. (1998) onde relatam que em porta enxertos de macieira a utilização associada do floroglucinol e IBA antecipou e aumentou o enraizamento *in vitro*, impedindo a formação de calos, apresentando uma formação de raízes em torno dos 90% aos 10 dias de inoculação. Na ausência de floroglucinol, o enraizamento máximo foi verificado aos 15 dias, concluindo que esta substância possui efeito estimulante no enraizamento desta espécie.

Lima (1998), ao avaliar o efeito do uso de aditivos do enraizamento, como os fenóis (floroglucinol, ácido cafeico, resorcina, hidroquinona e ácido clorogênico) e aminoácidos (fenilalanina, prolina e triptofano) juntamente com o uso do regulador de crescimento AIB na indução de raízes em plântulas de *Eucalyptus grandis in vitro*, constataram que o uso de floroglucinol induziu o enraizamento em um número maior de plântulas.

Rufato et al. (1999), verificou que houve aumento no enraizamento de *Prunus avium* com a adição do floroglucinol ao meio de cultura. Em diferentes clones de *Eucalyptus* segundo Almeida (2006) o floroglucinol proporcionou os percentuais mais elevados de enraizamento adventício.

De acordo com Dias (2002) o floroglucinol pode ser considerado um cofator do enraizamento, atuando sinergisticamente às auxinas, aumentando o espectro de ação destas. Segundo este autor, as cofatores agem, portanto, como protetores das auxinas. Além de parecerem ter uma função antioxidante, se ligando a radicais livres, impedindo, desta forma,

que tais radicais fiquem disponíveis para se oxidarem e, assim, formarem substâncias tóxicas que afetam negativamente o processo de enraizamento adventício.

Wilson e Van Standen (1990) citam que o floroglucinol provavelmente aumente o enraizamento pela influência no metabolismo da auxina ou, alternativamente, pela manutenção do potencial redox do tecido em seu estado reduzido.

8.4 Conclusões

O floroglucinol acelerou e aumentou a percentagem de enraizamento *in vitro* de microestacas de figueira.

9 Referências

ABRAHÃO, E.; ANTUNES, L. E. C.; SILVA, V. J. DA; OLIVEIRA, N. C. Poda e condução da figueira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.188, p.27-33, 1997.

ALMEIDA, J. R.; MARTINS, C. R.; DUTRA, L. F. Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* visando estabelecimento *in vitro*. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.15, n.1, p.54-60. 2006.

ALMEIDA, M. M.; SILVEIRA, E. T. Tratos culturais na cultura da figueira no sudoeste de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.188, p.27-33, 1997.

ALMEIDA, W. A. B.; SANTANA, G. S.; RODRIGUEZ, A. P. M.; COSTA, M. A. P. C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.296-300, 2002.

ALVARENGA, A. A.; ABRAHAO, E.; FRAGUAS, J. C.; CARVALHO, V. L.; SILVA, R. A.; SANTA CECILIA, L. V. C.; CUNHA, R. L.; SILVA, V. J. Figo (*Ficus carica* L.). In: TRAZILBO JR, J.P. MADELAINE V. (Org.). **101 culturas: manual de tecnologias agrícolas**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2007. p.365-372.

ALVES, M. N. **Cultura de tecidos de *Cecropia glaziovii* Sneth (Moraceae): Micropropagação vegetativa e regeneração por organogênese**. 1993. 101f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)-Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.

AMARAL, V. F. do. **Multiplicação *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell.** 2006. 60f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)-Faculdade de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

ANAHORY, H.; DARBAS, O.; ONGARO, H.; JEAN-PIERRE and P. Mion, *Serratia ficaria*: a misidentified or unidentified rare cause of human infections in fig tree culture zones, **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.11, n.36, p.3266–3272, 1998.

ANJOS SOBRINHO, A.; PASQUAL, M.; PAIVA, P. D. O. Efeito de diferentes concentrações de BAP sobre o desenvolvimento *in vitro* de gemas apicais de figo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 15., 1998, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1998. p.347.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRAS, L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa–SPI/Embrapa – CNPH, 1998. p.261-296.

AUGUSTO, C. S. S. **Micropropagação da amoreira-preta cv. brazos.** 2001. 132f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

AZEVEDO, J. L. MACCHERONO JÚNIOR, W.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microorganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biociologia: avanços na agricultura e na agorindústria.** Caxias do Sul: EDUCS, 2000. p.235-268.

BARBOSA, W.; CAMPO DALL'ORTO, F. A.; OJIMA, M.; MARTINS, F. P.; BOVI, V.; ASTRO, J. L. Produção de mudas da figueira 'Roxo de Valinhos', através de cultura *in vitro*. **O Agrônomo**, Campinas, v.44, n.3, p.6-10, 1992.

BARBOSA, W.; PIO, R.; VEIGA, R. F. A.; CHAGAS, E. A.; FELDBERG, N. P.; AMPAGNOLO, M. A.; DALASTRA, I. M. Efeito de concentrações do AIB no enraizamento *in vitro* de cultivares de figueira. **Biosci. J.**, Uberlândia, v.24, n.2, p.1-6, 2008.

BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S.; SOUZA, L. A. C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.**, Brasília, v.39, n.8, p.725-733, 2004.

BECK, S.L.; DUNLOP, R.; van STADEN, J. Micropropagation of *Acacia mearnsii* from *ex vitro* material. **Plant Growth Regulation**, Amsterdam, v.26, n.1, p.143-148, 1998.

BIASI, L. A. Fitotoxicidade de três antibióticos na cultura *in vitro* de abacateiro. **Bragantia**, Campinas, v.54, n.2, p.251-256, 1995.

BOBROFF, R. L.; LENZA, J. B.; PEREIRA, G. A.; ZANUZO, M. R.; RODRIGUES, A. B. C. Avaliação de diferentes concentrações de agrimicina para micropropagação de bananeira IAC 2001. **UNICIÊNCIAS**, Cuiabá, v.13, n.1, p.171-180, 2009.

BRAHM, R. U.; OLIVEIRA, R. P. de. Potencial de multiplicação *in vitro* de cultivares de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.3, p.507-510, 2004.

BRAGA, M. F; LISEI DE SA, M. E; MUSTAFÁ, P. C. Avaliação de um protocolo para multiplicação *in vitro* da bananeira (*Musa sp.*) cv. Caipira (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.215-219, 2001.

BRUM, G.R. **Micropropagação de figueira (*Ficus carica* L.)**. 2001. 41f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

BRUM, G. R.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.26, n.2, p.1403-1409, 2002. Edição Especial.

BUCHER, J. **Aspectos de conservação *in vitro* e micropropagação de *Brosimum gaudichaudii***. 2002. 118f. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABC, 1990. p.340-345.

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, 1998. v.1, p.87-132.

CAMPOS, D. C. Aspectos pós-colheita do figo. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte. v. 17, n.180, p.19-21. 1994.

CARAUTA, J. P. P.; DIAZ, B. E. **Figueiras no Brasil**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2002. p.85-86,

CHALFUN, N. N. J.; ABRAHÃO, E.; ALVARENGA, A. A.; REGINA, M. A.; PIO, R. **Poda e condução da figueira**. Lavras: UFLA, 2002. 12p. (Boletim Técnico, 104).

CHALFUN, N. N. J.; HOFFMANN, A. Propagação da figueira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.188, p.9-13, 1997.

CHALFUN, N. N. J.; PASQUAL, M.; HOFFMANN, A. **Fruticultura comercial: frutíferas de clima temperado**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 304p.

CHITARRA, M. I. F.; CARVALHO, V. D. de. Qualidade e industrialização de frutos temperados: pêssegos, ameixas e figos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.125, p.56-66, 1985.

CID, L. P. B.; ZIMMERMANN, M. J. **A contaminação *In Vitro* de Plantas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p.5-20. (Boletim de Pesquisa, 122).

COELHO, M. C. F.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CID, L. P. B.; LAMEIRA, O. A. Germinação de sementes de Sucupira Branca [*Peterodon pubescens* (Benth.) Benth] *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.1, p.38-48, 2001.

COSTA, A. S; ARRIGONI-BLANK, M. F; BLANK, A. F; MENDONÇA, A. B; AMÂNCIO, V. F; LEDO, A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v.25, n.1, p.68-72. 2007.

DANTAS, S.; OLIVEIRA, S.; CÂMARA, T. Contaminação microbiana no cultivo *in vitro* de plantas. In: LUZ, W. C. et al. **Revisão Anual de patologia de plantas**, Passo Fundo, v.10, n.1, p.391-407, 2002.

DEBERGH, P. C.; DE WAEL, J. Mass propagation of *Ficus lyrata*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.1, n.78, p.361-364, 1977.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN R. H., editors. **Micropropagation**. The Netherlands: Kluwer Academic, 1991. p.1-14.

DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN R. H. **Micropropagation**: technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.30-37. 1993.

DEMIRALAY, A.; YALCIN-MENDI, Y.; AKA-KACAR, Y.; CETINER, S. *In vitro* propagation of *Ficus carica* L. var. Bursa Siyahi through meristem culture. **Acta Horticulturae**, Wageningenn, v.480, n.1, p.165-167, 1997.

DIAS, J, M. M. **Cultura de células e tecidos vegetais**: propagação de plantas a partir da organogênese *in vitro*. [S.l.: s.n.], 2002. Notas de Aulas.

DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L.; TEIXEIRA, A. L. A.; GOMES, E. S. Avaliação dos efeitos da quebra da dominância apical e do BAP na multiplicação *in vitro* de *Helicônia stricta* Huber. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.35, p.232-237, 2004. Número Especial.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; TAKAKI, G. M. C.; MARIANO, R. L. R.; MACIEL, G. A. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.1, p.134-141, jan./fev. 2005.

DUHEM, F.; MERCIER, N.; BOXUS, P. Difficulties in the establishment of axenic *in vitro* cultures of field collected coffee and cacao germplasm. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.255, n.1, p.67-75, 1988.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION- FAO. **Crops production**. New York: FAOSTAT, 2010. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 7 maio 2010.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. (Ed.). **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221 p.

FERMINO JUNIOR, P. C.; NAGAO, E. O.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.37, n.84, p.427-435, 2009.

FERREIRA, E. A. **Micropropagação, calogênese e irradiação da figueira “Roxo de Valinhos”**. 2006. 103f. Tese (Doutorado em Fitotecnia)–Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

FERREIRA, M. G. R.; SANTOS, M. R. A.; BRAGADO, A. C. R. Propagação *in vitro* de cupuaçuzeiro: desinfestação de explantes florais. **Saber Científico**, Porto Velho, v.2, n.2, p.37-44, jul./dez., 2009.

FEITOSA, H. O.; GONÇALVES, F. M.; CARVALHO, M.; GUERRA, G. M.; Influência da adubação orgânica e da cobertura viva em figueira com irrigação suplementar. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, Fortaleza, v.3, n.2, p.88-94, 2009.

FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira “Roxo de Valinhos” em diferentes ambientes**. 2003. 110f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.1, p.49-55, 2004.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.50, n.1, p.151-158, 1968.

GAMBORG, O. L.; SHYLUK, J. P. Nutrition media and characteristics of plant cell and tissue cultures. In: THORPE, T.A. (Ed). **Plant tissue culture, methods and applications in agriculture**. New York: Academic Press, 1981. p.21-44.

GANEM, S. T. S. **Bactérias endofíticas em explantes e micropropagação de bananeira tetraplóide**. 2008. 91f. Dissertação. (Mestrado em Produção Vegetal)- Faculdade de Agronomia, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, 2008

GEORGE, E. F. **Plante propagation by tissue culture,:** the technology. 2.nd. Edington: Exegetics Limited, 1996. 1574p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics limites, 1984. 593p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Culturas de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPH, 1998. v.1, p.183-260.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCPT/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.99-169.

GUERRA, M. P.; COSTA, R. M. B. F. L. Propagação da figueira 'Roxo de Valinhos', através da cultura de meristemas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1987, Campinas. **Anais...** Campinas: SBF, 1987. p. 465-467.

GUNVER, G.; ERTAN, E.; AKSOY, U.; FERGUSON, L.; HEPAKSOY, S. A study on the propagation of figs by the tissue culture techniques. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.2, n.480, p.169-172, 1998.

HABIBA, U.; REZA, S.; SAHA, M. L.; KHAN, M. R.; HADIUZZAMAN, S. Endogenous bacterial contamination during *in vitro* culture of table banana: Identification and prevention. **Plant Tissue Culture**, Dordrecht, v.2, n.12, p.117-124, 2002.

HAELTERMAN, R. M.; DOCAMPO, D. M. *In vitro* propagation of mosaic-free fig (*Ficus carica* L.) cultivars, using thermotherapy and shoot tip cultures. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, Buenos Aires, v.25, n.3, p.15-22, 1994.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.

HARRY, I. S.; THORPE, T. A. Regeneration of plantlets through organogenesis from mature embryos of jack pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New York, v.37, n.2, p.159-164, 1994.

HOSSAIN, M.; RAHMAN, S. M.; ZAMAN, A.; JOARDER, O. I.; ISLAM, R. Micropropagation of *Morus laevigata* Wall from mature trees. **Plant Cell Reports**, New York, v.11, n.10, p.522-524, 1992.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v.2, p.371-393.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan, 1983. p.117-227.

HU, J. G.; GUO, J. S. A study on tissue culture of *Ficus carica*. **Journal of Nanjing Forestry University**, Nanjing, v.18, n.3, p.73-76, 1994.

JAIWALL, V. S.; NARAYAN, P. Plantlet regeneration from hypocotyl callus of *Solanum torvum* Swartz. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.119, n.1, p.381-383, 1985.

JONES, O. P., HATFIELD, S. G. S. Root initiation in apple shoot cultured *in vitro* with auxins and phenolics compounds. **Journal Horticultural Science**, Reino Unido, v.51, n.4, p.495-499, 1976.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. Provas de sensibilidade a agentes antimicrobianos. In: KONEMAN, E.W. **Diagnóstico microbiológico**. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p.795-865.

KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos e aplicaciones**. [S.l.: s.n.], 1991. p.41-77.

KUMAR, V.; RADHA, A.; CHITTA, S. K. *In vitro* plant regeneration of fig (*Ficus carica* L. cv. gular) using apical buds from mature trees. **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, n.1, p.717-720, 1998.

LAMEIRA, O .A.; LEMOS, O .F.; MENEZES, I .C.; PINTO, J. E. B. P. **Cultura de tecidos: manual**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000, 41p. (Documentos, 66).

LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WRIGHT, S. M.; WAITES, B.; CHEYNE, V. A.; WAITES, W.M. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Choisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.71, n.4, p.307-330, 1991.

LEKÇIOĞLU, S. A. B.; KÜDEN, M. A.; KAMBEROĞLU, V. E. Y. A. Kacar, “Meristem culture of Fig cv. Bursa Siyahi and AlKuden, In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FIG 3., 2005, Vilamoura. **Abstracts...**Vilamoura, Portugal: Universidade do Algarve, 2005, p.11.

LEMONS, E. E.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; NETO, C. E. R.; ALBUQUERQUE, M. M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.10, p.1359-1364, out. 2002.

LEONEL, S.; DAMATTO JUNIOR, E. R. Perfil radicular da figueira sob efeito de níveis de adubação orgânica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.1, p. 191-194, 2007.

LIMA, C. C. M. **Uso de aditivos e cofatores na rizogênese de plântulas de *Eucalyptus grandis* Hill. *in vitro***. 1998. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society**, Seattle, v.30, n.1, p.421-427, 1980.

MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; AVOZANI, O. A.; PETERS, J. A.; VIÉGAS, J.; TERRES, A. L.; ABIBIF, R. Colchicine effect on chromosome duplication of irrigated rice haploids obtained from anther culture In: ENCUENTRO LATINO AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., 1995, Puerto Iguazu. **Resumos...** Puerto Iguazu: REDBIO, 1995. p.76

MAKINO, R. K.; NAKARO, R. T.; MAKINO, P. J.; MURASHIGE, T. Rapid cloning os *Ficus* cultivars through aplication of *in vitro* methodology. **In vitro**, Largo, v.13, n.3, p.169, 1977.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrábida ex Steudel). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.11, n.2, p.93-101, 2001.

MHATRE, M.; BAPAT, V. A.; RAO, P. S. Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L). **Plant Cell Reports**, New York, v.4, n.2, p. 78–80, 1985.

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

MONTARROYOS, A. V. V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, v.2, n.36-37, p.5-10, 2000.

MORAES, A. M.; ALMEIDA, F. A. C.; CAZÉ FILHO, J. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de gemas axilares de abacaxizeiro. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.1. n.2, p.39-44. 2007.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, n.1, p.1335–166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.1, p.473-497, 1962.

MURCH, S. J.; RAGONE, D.; SHI, W. L.; ALAN, A. R.; SAXENA, P. K. *In vitro* conservation and sustained production of breadfruit (*Artocarpus altilis*, Moraceae): Modern technologies for a tradicional tropical crop. **Naturwissenschaften**, Germany, v.95, n.2, p.99 - 107, 2008.

MURITHI, M.; RAGAN, T. S.; WAITE, B. H. *In vitro* propagation of fig through shoot tip culture. **HortScience**, Alexandria, v.17, n.2, p.86 -87, 1982.

NAUE, C. R.; BENITIZ, L. B.; MEDEIROS, C.V. Eliminação de contaminantes microbianos da cultura de tecidos de *Nicotiana tabacum* L. In: CONGRESSO INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 16., 2007, Pelotas. **Resumos**. Pelotas: Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, 2007. p. 1-5.

NIEDEZ, R. P.; BAUSHER, M. G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse and field grows trees. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, New York, v. 38, n.1, p.468-471, 2002

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; MARTINS C. F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do Ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.3, n. 1, p.11-8, 2001.

NOBRE, J.; ROMANO, A.; AKSOY, U.; FERGUSON, L.; HEPAKSOY, S. *In vitro* cloning of *Ficus carica* L. adult trees. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.1, n.55, p.161-164, 1998.

NORBERTO, P. M.; CHALFUN, N. N. J.; PASQUAL, M.; VEIGA, R. D.; PEREIRA, G. E.; MOTA, J. H. Efeito da época de estaquia e do AIB no enraizamento de estacas de figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.3, p.533-541, 2001.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; SILVA, F. O. X. **Produção de mudas de amora-preta por meio de cultura de tecidos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 23p. (Sistemas de Produção, 6).

OLIVEIRA, H. S. **Comportamento de cultivares de bananeira (*Musa spp*) resistentes a doenças no processo de micropropagação**. 2010. 79f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal Rural da Amazônia, 2010.

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

PAIVA, R.; PAIVA, P. D. **Textos acadêmicos: cultura de tecidos**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 329 p.

PAIVA, P. D. O.; MAYER, M. B. D.; CAMPOS, R. J. C.; RODRIGUES, V. A.; PASQUAL, M. Propagação *in vitro* de gloxínia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.3, n.2, p.29-41, 1997a.

PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; PASQUAL, M.; PAIVA, L. V. Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Banks.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.5, p.1031-1037, 2004.

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

PATTNAIK, S. K.; SAHOO, Y.; CHAND, P. K. Micropropagation of a fruit tree *Morus australis* Poir.syn *M. acidosa* Griff. **Plant Cell Reports**, New York, v.15, n.11, p.841-845, 1996.

PENTEADO, S. R. O cultivo da figueira no Brasil e no mundo. In: CORRÊA, L. S.; BOLOANI, A. C. (Ed.) **Cultura da figueira: do plantio à comercialização**. Ilha Solteira: FAPESP, 1999. p.1-16.

PEREIRA, F. M.; NACHTIGAL, J. C. Botânica, biologia e cultivares de figueira. In: CORRÊA, L. S.; BOLLIANI, A. C. (Ed.). **Cultura da figueira – do plantio à comercialização**. Ilha Solteira: FAPESP, 1999. p.25-35.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* da batata em meios semi-sólido e líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.11, p.1273-1279, 2003.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.7, p.827-834, 2003.

PEREIRA, G. A.; ALVES, L. M. S. M.; BOLIANI, A. C. FURLANI JUNIOR, E.; MORAES, A. M. de. Controle de contaminantes em explantes de bananeira Grande Naine na micropropagação *in vitro*. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v.4, n.2, p.35-39, jun. 2010.

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

POLLOCK, K.; BARFIELD, D. G.; SHIELD, R. The toxicity of antibiotics to plant cell culture. **Plant Cell Reports**, New York, v.2, n.1, p.36-39, 1983.

PONTIKINS, C. A.; MELAS, P. Micropropagation of *Ficus carica* L. **HortScience**, Alexandria, v.21, n.1, p.153 –154, Feb. 1986.

PRADO FILHO, L. G. Emprego de antibióticos em agricultura. In: LACAZ, C. S. (Coord.). **Antibióticos**. São Paulo: Blucher, 1975. p.472-509.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology***, Oxon, v.38, n.1, p.115-124, 2002.

REZENDE, J.; PASQUAL, M.; CARVALHO, S. P.; PEREIRA, A. R.; VILLA, F. Influência do meio de cultura e concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. ***Scientia Agraria***, Curitiba, v.9, n.1, p.21-26, 2008.

RIBAS, L. L. F; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI.; GUERRA, M. P. Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polyneuron*. ***Ciência Florestal***, Santa Maria, v.13, n.1, p.115-122, 2003.

RIBAS, L. L. F; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI.; GUERRA, M. P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. ***Revista Árvore***, Viçosa, v.29, n.4, p.517-524, 2005.

RIGITANO, O. **Instruções para cultura da figueira**. Campinas: IAC, 1964. 30 p.

RODRIGUES, M. G. F.; CORREA, L. S.; BOLIANI, A. C. Avaliação de seleções mutantes de figueira cv. Roxo-de-Valinhos. ***Revista Brasileira Fruticultura***, Jaboticabal, v.1, n.3, p. 771-777, 2009.

RODRIGUES, P. H. V. Estabelecimento *in vitro* de *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae), ***Scientia agrícola***, Piracicaba, v.62, n.1, p.69-71, 2005.

ROCHA, C. S. **Micropropagação da canjarana** (*Cabralea canjerana*). 2005. 74f. Dissertação (Mestrado em Botânica)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ROCHA, P. S.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. multiplicação e alongamento *in vitro* do porta-enxerto de *prunus*. ***Bioscience Journal***, Uberlândia, v.25, n.1, p. 69-74, 2009.

SAADAT Y. A.; HENNERTY, M. J. Factors affecting shoot multiplication of *Persian walnut* (*Juglans regia* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.95, n.1, p.257- 260-2002.

RUFATO, L; ROSSI, A.; LOMBARDI, S. R.; RIBEIRO, E; KERTEN, E. Efeito de diferentes concentrações de floroglucinol no enraizamento de estacas lenhosas de duas cultivares de pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch) tratadas com AIB. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.21, n.3, p.297-300, 1999.

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de annonaceae**. 2003. 237f. Tese (Doutorado em Agronomia-Fisiologia Vegetal)-Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SANTOS, E.; RAMALHO, R. S. O gênero *Ficus* (Moraceae) L. em Viçosa-MG. **Revista Ceres**, Viçosa, v.44, n.256, p.646-665, 1997.

SCHMILDT, E. R.; GUMARÃES, C. T.; LANI, E. R. G.; TEIXEIRA, S. L. Efeito do floroglucinol na reação morfogênica *in vitro* de segmentos internodais de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv. Pêra. **Revista Ceres**, Viçosa, n.269, v.47, p.113-120, 2000.

SCHUCH, M. W.; DAMIANI, C. R.; SILVA, L. C.; ERIG, A. C. Micropropagação como técnica de rejuvenescimento em mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar climax. **Ciência. Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.3, p.814-820, 2008.

SMITH, J. **Micropropagation of the gynea lily**. Barton: Rural Industries Research & Development Corporation, 2000. 50p.

SILVA, E. M. P.; SOUZA, V. A. B.; SILVA, K. J. D.; ANDRADE, F. N. Desinfestação de explantes caulinares de umbu-cajazeira por hipoclorito de sódio e bicloreto de mercúrio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais...** Belém: SBF, 2002. 4p.

SILVA, E. S. B. **Propagação *in vitro* de *Prunus* spp.** 2004. 115f. Tese (Doutorado em Fruticultura de clima Temperado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

SILVA, T. S.; NHUT, D. T.; TANAKA, M.; FUKAI, S. The effect of antibiotics on the *in vitro* growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v.97, n.3, p.397-410, 2003.

SILVA, L. C.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A.; ERIG, A. C.; ANTUNES, L. E. C. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Delite. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v.12, n.4, p.405-408, outubro, 2006.

SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S; SILVEIRA, D. G; SOUZA, F. V. D; FARIA, G. A; NETO, H. P. S; SANTOS SEREJO, J. S; SILVA, K. M; COSTA, M. A. P. C; SOARES, T. L; JUNGHANS, T. G; ALMEIDA. W. B. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006. p.11-151.

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

SOBRINHO, A. A.; PASQUAL, M.; PAIVA, P. D. O. Efeito de diferentes concentrações de BAP sobre o desenvolvimento *in vitro* de gemas apicais de figo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 15., 1988, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: SBF, 1998. p.347.

SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M. G.; NAIR, Y. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult to propagate cultivars of apple. **Plant Science Letters**, Limerick, v.24, n.1, p.1-9, 1982.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848.p.

TEIXEIRA, J. B.; CRUZ, A. R. R.; FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. S. Biotecnologia aplicada à produção de mudas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.3, n.19, p.42-47, 2001.

TEIXEIRA, J. B.; CRUZ, A. R. R.; FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. S. Biotecnologia aplicada à produção de mudas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.3, n.19, 2001.

TOMBOLATO, A. F. C; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. p. 15-17. (Boletim Técnico, 174).

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

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. P.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. v.1, p.133–145.

VANETTI, C. A.; OLIVEIRA, J. R. Antibióticos e benomyl no controle de contaminantes em segmentos nodais de cafeeiro cultivados *in vitro*. **Revista Ceres**, Viçosa, v.49, n.284, p.431-441, 2002.

VIANNA, G. R.; COUTO, F. A. A.; OLIVEIRA, A. B., ZAMBOLIM, L.; MARIA, J. A. rifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. **Bragantina**, Campinas, v.56, n.2, p.249-254, 2003.

VILLA, F.; ARAUJO, A. G. de; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta “Ébano” em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência Agrotéc.**, Lavras, v.29, n.3, p.582-589, 2005.

WILLIAMSON, B.; COOKE, D. E. L.; DUNCAN, J. M., LEIFERT, C., BREESE, W. A.; SHATTOCK, R. C. Fungal infections of micropropagated plants at weaning: a problem exemplified by downy mildews in *Rubus* and *Rosa*. **Plant Cell: Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.52, n.1-2, p.89-96, 1998.

WILSON, P. J., VAN STADEN, J. Rhizocaline, rooting cofactors and the concept of promoters and inhibitors of adventitious rooting – a review. **Annals of Botany**, London, v.66, n.4, p.479-490, 1990.

WHITE, P. R. Nutrient deficiency studies and improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. **Growth**, Lakeland, v.7, n.1, p.53-65, 1943.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG: UFV, cap.3, 2007, p.57– 74.

ZANOL, C. G.; FORTES, G. R. L.; CAMPOS, A. D.; SILVA, J. B.; CENTELLAS, A. Q. Enraizamento *in vitro* e atividade da peroxidase do porta-enxerto de macieira “Marubakaido” tratado com ácido indolbutírico e floriglucinol. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.1 n.10, p.65-68, 1998.

ZIGIOTTO, D. C. **Compostos fenólicos e atividade antioxidante em plantas *Salvia officinalis* (L) micropropagadas**, 2007. 54f. Dissertação (Mestrado)–Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu- UNESP, 2007.

ZIMMERMAN, R .H. Apple. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V; YAMADA, U. **Handbook of plant cell culture**, New York, v.2, n.1, p.369-395, 1984.