

Meio de cultura, reguladores de crescimento e formas de vedação de tubos de ensaio na multiplicação *in vitro* de candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less)Culture medium, growth regulators and ways of sealing test tubes on *in vitro* multiplication of candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less)Natane Amaral Miranda<sup>1</sup>, Miranda Titon<sup>2</sup>, Israel Marinho Pereira<sup>2</sup>, José Sebastião Cunha Fernandes<sup>3</sup>, Janáina Fernandes Gonçalves<sup>4</sup> e Fabiana Miranda Rocha<sup>5</sup>**Resumo**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do meio de cultura, de reguladores de crescimento e formas de vedação de tubos de ensaio na multiplicação *in vitro* de gemas axilares de *Eremanthus incanus*. Explantes retirados de plantas germinadas *in vitro*, isentas de contaminação, foram inoculados em meios de cultura MS 100%, MS 50%, WPM 100% e WPM 50%, e avaliou-se o número de brotações emitidas no cultivo inicial e em três cultivos subsequentes. Combinações de ANA (0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) e BAP (0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup>) foram utilizadas na multiplicação *in vitro* da espécie e avaliadas quanto ao número de brotações emitidas no cultivo inicial e em dois cultivos subsequentes. Avaliou-se a influência de três formas de vedação dos tubos de ensaio (tampa, filme e fita) quanto ao número e qualidade de brotações emitidas no cultivo inicial e em três subcultivos. Os melhores resultados de multiplicação de gemas foram obtidos utilizando o meio de cultura MS 100% e com a combinação de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Tubos de ensaio vedados com fita microporosa possibilitaram melhor desenvolvimento dos explantes *in vitro*.

**Palavras-chave:** Cultura de tecidos, multiplicação, espécie nativa.

**Abstract**

The objective of this study was to evaluate the influence of culture medium, growth regulators and ways of sealing test tubes *in vitro* multiplication of axillary buds of *Eremanthus incanus*. Explants from plants germinated *in vitro*, free from contamination, were inoculated in culture medium MS 100%, MS 50%, WPM 100% and WPM 50%, and we evaluated the number of shoots emitted in the initial culture and in three subsequent cultures. Combinations of NAA (0,5 and 1,0 mg L<sup>-1</sup>) and BAP (0,1; 0,5; 1,0 and 1,5 mg L<sup>-1</sup>) were used in vitro multiplication of the species and the number of shoots issued in the initial culture and two subsequent cultures was evaluated. We also evaluated the influence of three forms of sealing the test tubes (cover, film and tape) on the number and quality of shoots emitted in the initial culture and three subcultures. The best bud multiplication results were obtained using the culture medium MS 100% with the combination of 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP and 0,5 mg L<sup>-1</sup> NAA. Test tubes sealed with micro porous tape led to better development of the explants *in vitro*.

**Keywords:** Tissue culture, multiplication, native species.

<sup>1</sup>Doutoranda em Ciência florestal. UFV – Universidade Federal de Viçosa. Av. Peter Henry Rolfs, s/n - Campus Universitário 36570-900 - Viçosa - MG, Brasil. E-mail: [nataneamaral@gmail.com](mailto:nataneamaral@gmail.com).

<sup>2</sup>Professor(a) Associado(a) do Departamento de Engenharia Florestal. UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Campus JK. Rodovia MGT 367 Km 583, 5000 - Alto do Jacuba - 39100-000 - Diamantina, MG, Brasil. E-mail: [mirandatiton@gmail.com](mailto:mirandatiton@gmail.com); [imarinhopereira@gmail.com](mailto:imarinhopereira@gmail.com).

<sup>3</sup>Professor Associado do Departamento de Agronomia. UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Campus JK. Rodovia MGT 367 Km 583, 5000 - Alto do Jacuba - 39100-000 - Diamantina, MG, Brasil. E-mail: [cunha.fernandes@yahoo.com.br](mailto:cunha.fernandes@yahoo.com.br).

<sup>4</sup>Professora Adjunto do Instituto de Ciências Agrárias. UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Campus Unai. Avenida Vereador João Narciso, 1380 - Cachoeira - 38610-000 - Unai, MG, Brasil. E-mail: [gonferja@yahoo.com.br](mailto:gonferja@yahoo.com.br)

<sup>5</sup>Graduanda em Engenharia Florestal. UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Campus JK. Rodovia MGT 367 Km 583, 5000 - Alto do Jacuba - 39100-000 - Diamantina, MG, Brasil. E-mail: [fabiana.engflorestal@gmail.com](mailto:fabiana.engflorestal@gmail.com).

## INTRODUÇÃO

A candeia, *Eremanthus incanus* (Less.) Less, é uma espécie florestal que ocorre no nordeste (Bahia) e sudeste (Minas Gerais) brasileiro, nos domínios do Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica (LOEUILLE, 2014). Possui significativa importância na biodiversidade brasileira, com valor econômico, ecológico e social, sendo dela extraídos produtos de alto valor comercial, como o óleo essencial e sua madeira de elevada durabilidade (SCOLFORO et al., 2012).

A produção comercial de mudas de candeia é realizada, exclusivamente, via seminal, e pelas dificuldades de produção, são poucos os viveiros que possuem controle nos aspectos relacionados ao processo (DAVIDE; MELO, 2012). Iniciar o processo de clonagem é importante em razão da necessidade de melhorar a qualidade dos povoamentos a serem implantados (MELO et al., 2012).

A propagação vegetativa de candeia pode trazer em curto prazo, ganhos substanciais na produtividade de candeais implantados, visto que permite maximizar o ganho obtido em programas de melhoramento, ou de indivíduos superiores que ocorrem em candeais nativos ou em reflorestamentos seminais (DAVIDE; MELO, 2012).

A micropropagação, enquadrada como uma técnica de propagação vegetativa *in vitro*, encontra-se embutida nos programas de pesquisa na área florestal, onde tem sido utilizada na preservação de germoplasma, produção de plantas livres de doenças, multiplicação rápida de plantas em períodos de tempo e espaço físico reduzidos, rejuvenescimento clonal e produção de mudas de genótipos selecionados (XAVIER et al., 2013).

A proliferação de gemas axilares é o método mais utilizado na propagação *in vitro* de várias espécies lenhosas (HUBNER et al., 2007; COSTA et al., 2010; HORBACH et al., 2011; FERMINO JR.; PEREIRA, 2012). As etapas deste método envolvem a seleção do explante, a multiplicação dos propágulos vegetativos, o enraizamento e a aclimação das mudas obtidas (XAVIER et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013).

O controle de cada uma dessas fases geralmente é feito pela proporção entre os reguladores de crescimento vegetal, principalmente auxinas e citocininas (DAVIDE; MELO, 2012), porém vários elementos, quando adicionados ao meio de cultura, influenciam o desenvolvimento *in vitro*, tanto na fase de multiplicação quanto nas demais fases da micropropagação da planta (GEORGE et al., 2008).

Um dos principais desafios da multiplicação *in vitro* baseia-se em estabelecer as melhores combinações de elementos em meio de cultura que proporcionem o crescimento e desenvolvimento adequados dos explantes de espécies lenhosas (OLIVEIRA et al., 2013), bem como ajustar as condições ambientais de cultivo, como o tipo de vedação dos frascos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do meio de cultura, de reguladores de crescimento e de formas de vedação de tubos de ensaio na multiplicação *in vitro* de gemas axilares de *Eremanthus incanus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal e condições de cultivo

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Melhoramento Florestal, do Departamento de Engenharia Florestal, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, em Diamantina, Minas Gerais, entre outubro de 2013 e dezembro de 2014.

Plantas germinadas *in vitro* e isentas de contaminação foram utilizadas como fontes doadoras de explantes. Para a germinação e, em todos os experimentos, o meio de cultura foi suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-Inositol e 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP e, teve o pH ajustado para 5,8±0,02 antes da inclusão de 6 g L<sup>-1</sup> de ágar MERCK®. O meio foi autoclavado por 15 minutos à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm, e resfriado antes da inoculação do material vegetal. Após inoculação, os experimentos foram conduzidos em sala de cultura com temperatura de 25±2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### Estabelecimento de culturas assépticas

Sementes de candeia, coletadas em outubro de 2013 em uma área de ocorrência natural da espécie, situada nos limites da UFVJM, foram beneficiadas e mantidas em temperatura ambiente por sete meses.

Para germinação *in vitro*, as sementes foram inicialmente imersas em solução de fungicida Orthocide na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>, por 15 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos e em solução de hipoclorito de sódio a 5%, adicionada de 4 gotas de tween 20 para cada 100 ml de solução, por 10 minutos.

Durante a desinfestação, fez-se a separação das sementes quanto à densidade das mesmas, de modo que somente as sementes que imergiram na solução de hipoclorito foram utilizadas. Logo após, fez-se o enxágue em água deionizada e autoclavada.

Inoculou-se uma semente por tubo de ensaio (25x150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura constituído por sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionado de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Os tubos foram mantidos em sala de cultura até a planta germinada atingir cerca de 5 cm de altura, sendo então retirados segmentos nodais de 1 cm contendo gemas axilares, os quais foram utilizados como explantes.

### **Experimento 1 – Meio de cultura**

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL dos meios de cultura MS ou WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) com 50 ou 100% das concentrações de sais e vitaminas, adicionado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,6 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP), 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno acético (ANA).

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos (MS 50%, MS 100%, WPM 50% e WPM 100%), quatro repetições e cinco tubos com um explante por repetição. Este experimento foi constituído pelo cultivo inicial e três cultivos subsequentes (subcultivos 1, 2 e 3), com intervalos de 30 dias, sendo em cada um deles repetidos os procedimentos descritos anteriormente. Ao final de cada cultivo, fez-se a avaliação do número de brotações emitidas por explante. Na avaliação, foram considerados em cada repetição apenas os tubos contendo plantas vivas para cálculo das médias.

### **Experimento 2 – Concentrações de BAP e ANA**

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Foram utilizadas as concentrações de 0,1; 0,5; 1 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP combinadas com 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

Adotou-se o DIC em esquema fatorial 4x2 (quatro concentrações de BAP e duas concentrações de ANA) com quatro repetições e cinco explantes por repetição, sendo um explante por tubo de ensaio. Este experimento constituiu-se do cultivo inicial e dois cultivos subsequentes (subcultivos 1 e 2), com intervalos de 30 dias, sendo em cada um deles repetidos os procedimentos anteriormente descritos. Ao final de cada cultivo, avaliou-se o número de brotações emitidas por explante.

### **Experimento 3 – Formas de vedação**

Explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS, adicionado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

Após a inoculação de um segmento nodal por tubo de ensaio, diferentes formas de vedação dos tubos compuseram os tratamentos, sendo: tampas de Kimble em polietileno (tampa), plástico filme ALPFILM® (filme) e fita microporosa branca CREMER® (fita).

O experimento foi instalado em DIC com três tratamentos (formas de vedação), quatro repetições e seis tubos com um explante por repetição. Foram realizados um cultivo inicial e três cultivos subsequentes (subcultivos 1, 2 e 3) com intervalo de 30 dias, sendo em cada um deles repetidos os procedimentos anteriormente descritos.

Ao final de cada subcultivo, avaliou-se o aspecto visual (vigor) da parte aérea, classificado numa escala de 0 a 3 (onde: 0 - oxidado, 1 - ruim, 2 - médio e 3 - bom) (Figura 2), o percentual de tubos com presença de clorose foliar, o número de folhas, o número de brotações emitidas e o percentual de tubos com rebaixamento do meio de cultura.

O rebaixamento do meio de cultura foi observado visualmente pela diminuição do volume inicial de meio (10 mL) contido nos tubos de ensaio. Para o terceiro subcultivo também foi avaliada a massa seca (g) das brotações, obtido pela secagem em estufa a 60°C por 72 horas.

## Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, testes de média e análise de regressão com o auxílio do software R versão 3.0.1 (R CORE TEAM, 2013) utilizando os pacotes ExpDes.pt (FERREIRA et al., 2013) e Stats (R CORE TEAM, 2013).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento 1 – Meio de cultura

Foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), para o número de brotações emitidas no cultivo inicial e nos subcultivos 1 e 2.

Para o cultivo inicial, os meios WPM e MS 100% apresentaram melhor desempenho para emissão de brotações quando comparados ao WPM 50%. Nos dois cultivos subsequentes, o meio MS 100% foi superior ao WPM 50% e MS 50%, e no subcultivo 2 também foi superior ao meio WPM 100% (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número médio de brotações por explante de *Eremanthus incanus*, em função dos tipos de meio, para o cultivo inicial e para os subcultivos 1 e 2.

**Table 1.** Mean number of shoots per explant of *Eremanthus incanus*, according to medium type, for the initial culture and the subcultures 1 and 2.

	Cultivo inicial	Subcultivo 1	Subcultivo 2
MS 100%	2,80 a	4,13 a	3,90 a
MS 50%	2,00 ab	1,88 b	2,13 b
WPM 100%	2,90 a	2,94 ab	2,09 b
WPM 50%	1,75 b	2,06 b	1,84 b

Médias seguidas por letras diferentes, dentro de cada subcultivo, diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. Não há uma formulação padrão, mas o meio MS, com suas modificações e diluições, tem sido utilizado com sucesso para diversas espécies (GEORGE et al., 2008; WERNER et al., 2010; AHMED et al., 2011; GOLLE et al., 2012). A superioridade do meio MS em relação a outros meios de cultura é muitas vezes justificada pela diferença observada na quantidade de nitrogênio presente, sendo a concentração deste elemento maior no meio MS (FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2001; RODRIGUES et al., 2011).

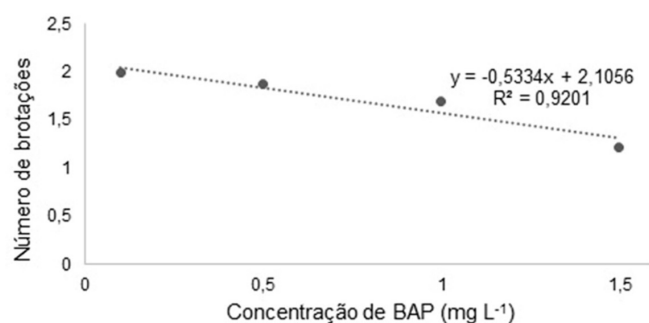
O meio nutritivo em que as plantas são cultivadas é responsável pelo fornecimento dos nutrientes necessários para o crescimento da cultura, sendo que o sucesso do processo de micropropagação da planta é fortemente influenciado pela natureza do meio de cultura usado (GEORGE et al., 2008). Sua principal função, portanto, é a de fornecer substâncias essenciais para o crescimento e controlar, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Fracaro e Echeverrigaray (2001) estudaram a influência dos meios de cultura MS (com 100, 50 e 25% das concentrações de sais), QL (QUOIRIN; LEPOIVRE, 1977), B5 (GAMBORG et al., 1968), NN (NITSCH; NITSCH, 1969) e N6 (CHU et al., 1975) na micropropagação de *Cunila galioides*, onde observaram que o meio MS, em todas as concentrações de sais testadas, e o meio NN permitiram maior produção de brotos, sendo observados brotos de maior tamanho com meio MS.

Na micropropagação de *Gymnema sylvestre*, o meio de cultura MS mostrou-se superior aos meios B5, SH (SCHENK; HILDEBRANDT, 1972), WPM e White (1963) quanto à multiplicação e comprimento de brotos (KOMALAVALLI; RAO, 2000). Segundo os autores, maiores concentrações de sais são requisitadas pela espécie para seu desenvolvimento. Brondani et al. (2010) concluíram que para *Liquidambar styraciflua* o meio de cultura MS apresentou efeito superior em comparação com o meio WPM. O meio de cultura MS 100% foi também satisfatório na multiplicação de gemas axilares de acácia (DISARZ; CORDER, 2009).

### Experimento 2 - Concentrações de BAP e ANA

Para o número de brotações emitidas, foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ) com relação às concentrações de BAP utilizadas no cultivo inicial. O uso de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP proporcionou maior emissão de brotações (1,98), e observou-se uma tendência de queda do número médio de brotações com o aumento da concentração de BAP no meio de cultura (Figura 1).



**Figura 1.** Número de brotações emitidas em resposta às concentrações de BAP no cultivo inicial de segmentos nodais de *Eremanthus incanus*.

**Figure 1.** Number of shoots issued in response to BAP concentrations in the initial cultivation of *Eremanthus incanus*.

Para as concentrações de ANA, observou-se diferença significativa no subcultivo 2, onde com o uso de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA foram produzidas 2,21 brotações e com o aumento da concentração para 1,0 mg L<sup>-1</sup> a média observada decresceu para 1,38 brotações.

Apesar das interações entre os reguladores de crescimento BAP e ANA não terem sido significativas nos 3 cultivos ( $p > 0,05$ ), observou-se que o uso de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA combinado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP apresentou valores crescentes de número de brotações nos subcultivos, atingindo média de brotações de 2,65 no último cultivo, sendo o maior valor observado no experimento (Tabela 2).

**Tabela 2.** Número médio de brotações emitidas em resposta às combinações de concentrações de ANA e BAP em meio de cultura MS, no cultivo inicial (C.I) e subcultivos 1 (Sc1) e 2 (Sc2) de *Eremanthus incanus*.

**Table 2.** Number of shoots emitted in response to the NAA concentrations combined with BAP concentrations in culture medium MS, in initial culture (C.I) and subcultures 1 (Sc1) and 2 (Sc2) of *Eremanthus incanus*.

ANA (mg/L)	BAP (mg/L)											
	0,1			0,5			1,0			1,5		
	C.I	Sc1	Sc2	C.I	Sc1	Sc2	C.I	Sc1	Sc2	C.I	Sc1	Sc2
0,5	2,10	1,83	2,10	2,00	1,96	2,31	1,84	2,36	2,65	1,26	2,06	1,79
1,0	1,88	2,35	1,77	1,74	1,54	1,25	1,55	1,56	1,13	1,18	1,79	1,38

Segundo Xavier et al. (2013), os reguladores de crescimento são de grande importância no meio de cultura, dada sua atuação no crescimento e controle, em grande parte, do padrão de desenvolvimento *in vitro* das plantas, sendo que a utilização e os teores de cada regulador variam em função dos objetivos, da espécie e do tipo de explante cultivado.

Dentre os reguladores de crescimento, as auxinas e citocininas são, sem dúvida, os mais importantes (GEORGE et al., 2008). A grande dificuldade encontrada, porém, é a definição para cada espécie do balanço hormonal citocinina/auxina ideal (XAVIER et al., 2013).

Segundo Cordeiro et al. (2014), em seu trabalho com *Eucalyptus globulus*, as citocininas são indispensáveis para a quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares, sendo a sua concentração e a combinação com as auxinas os fatores que mais influenciaram o sucesso da multiplicação *in vitro*, que também foi afetada de maneira diferenciada pelos meios de cultura.

Na multiplicação *in vitro* de *Eremanthus erythropappus*, Rosal et al. (2007) observaram que o uso de ANA e BAP, ambos na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup>, mostrou-se eficaz na formação de brotos. Para *Dioscorea rotundata*, os fitormônios ANA e BAP também foram importantes na propagação *in vitro*, uma vez que combinações de ambos favoreceram o desempenho da espécie (EZEIBEKWE et al., 2009).

### Experimento 3 - Formas de vedação

Houve diferenças significativas para as características avaliadas nos subcultivos ( $p < 0,05$ ), indicando que as formas de vedação dos tubos de ensaio influenciam o desenvolvimento das plantas *in vitro* (Tabela 3).

No cultivo inicial, as características percentual de clorose e rebaixamento do meio de cultura diferiram entre os tratamentos. No subcultivo 1, houve diferença no vigor, número de brotações emitidas e rebaixamento do meio de cultura. No subcultivo 2, as características que diferiram devido aos tratamentos foram o vigor e o rebaixamento do meio. Já no terceiro subcultivo, houve diferença no vigor, rebaixamento do meio e massa seca das brotações (Tabela 4).

**Tabela 3.** Resultado da análise de variância para as características vigor, clorose foliar, número de folhas (NF), número de brotações (NB) e rebaixamento do meio (RM) no cultivo inicial e subcultivos 1, 2 e 3 e para a característica massa seca (MS) para o subcultivo 3, em resposta às formas de vedação de tubos de ensaio para *Eremanthus incanus*.

**Table 3.** Results of analysis of variance for the characteristics vigor, leaf chlorosis, leaf number (NF), shoot number (NB) and lowering of the medium (RM) in the initial culture and subcultures 1, 2 and 3 and the characteristic dry weight (MS) to the subculture 3 in response to forms of sealing test tubes for *Eremanthus incanus*.

Quadrados médios (Cultivo inicial)							
FV	GL	Vigor	Clorose	NF	NB	RM	
Vedação	2	0,009 <sup>ns</sup>	2456,48*	13,409 <sup>ns</sup>	0,525 <sup>ns</sup>	9884,3*	
Resíduo	9	0,137	151,54	3,448	0,279	46,3	
CV(%)		23,55	39,22	24,94	24,85	12,25	
Quadrados médios (Subcultivo 1)							
FV	GL	Vigor	Clorose	NF	NB	RM	
Vedação	2	1,266*	300,00 <sup>ns</sup>	27,495 <sup>ns</sup>	2,771*	5023,1*	
Resíduo	9	0,125	501,540	7,075	0,149	231,5	
CV(%)		16,53	99,53	22,33	14,03	49,79	
Quadrados médios (Subcultivo 2)							
FV	GL	Vigor	Clorose	NF	NB	RM <sup>(1)</sup>	
Vedação	2	1,113*	286,340 <sup>ns</sup>	1,422 <sup>ns</sup>	1,391 <sup>ns</sup>	5213,30*	
Resíduo	9	0,224	255,79	5,281	0,517	120,80	
CV(%)		27,47	54,57	22,65	27,52	23,79	
Quadrados médios (Subcultivo 3)							
FV	GL	Vigor	Clorose <sup>(2)</sup>	NF	NB	RM	MS
Vedação	2	1,336*	718,26 <sup>ns</sup>	1,079 <sup>ns</sup>	0,115 <sup>ns</sup>	7228,00*	0,0013*
Resíduo	9	0,100	352,82	9,835	0,230	422,50	0,0003
CV(%)		22,12	53,81	37,01	25,51	41,69	46,23

FV: Fonte de Variação; GL: Graus de Liberdade; CV: Coeficiente de variação; \* Diferença significativa a 5% de significância; <sup>ns</sup> Diferença não significativa a 5% de significância; <sup>(1)</sup> valores transformados para arcsen [raiz (x/100)] por não apresentarem normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk a 5% de significância; <sup>(2)</sup> valores transformados para arcsen [raiz (x/100)] por não apresentarem homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett a 5% de significância.

**Tabela 4.** Valores médios para as variáveis clorose, rebaixamento do meio de cultura (RM), vigor, número de brotações (NB) e massa seca (MS) nos diferentes cultivos de *Eremanthus incanus*, em resposta às formas de vedação.

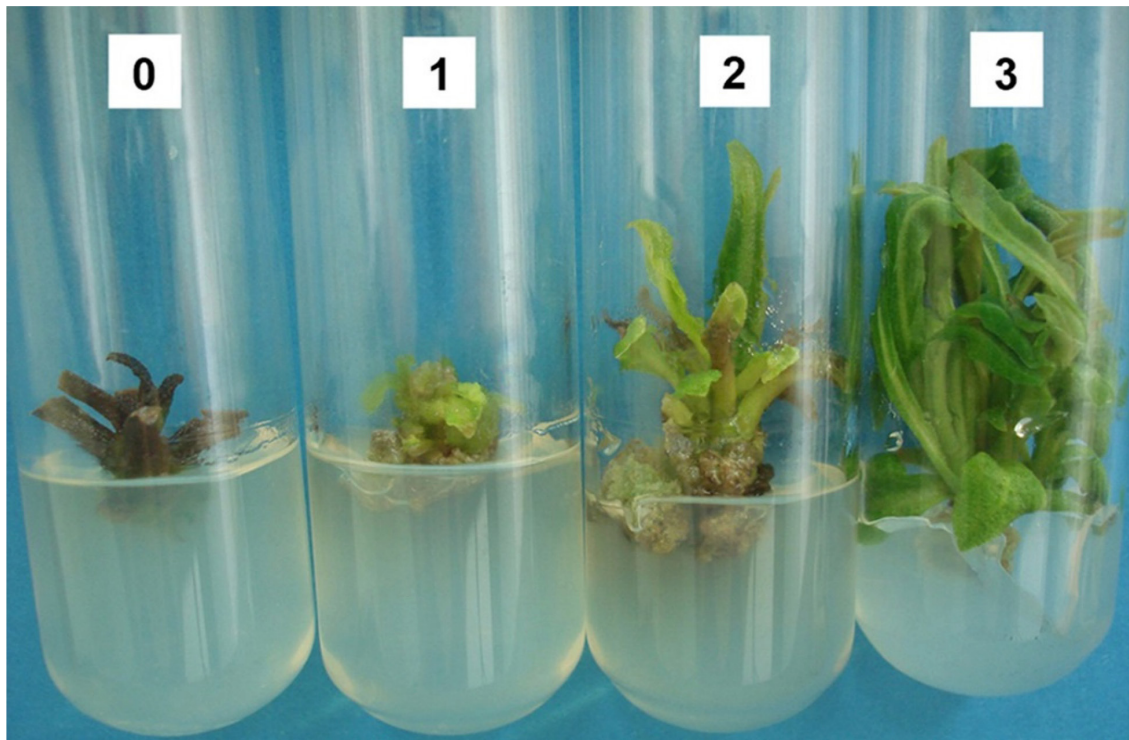
**Table 4.** Mean values for variables chlorosis, lowering of the medium (RM), force, number of shoots (NB) and dry weight (MS) in the different cultures of *Eremanthus incanus* in response to forms of sealing.

Tratamento	Cultivo inicial		Subcultivo 1		
	Clorose	RM	Vigor	NB	RM
Tampa	54,17 a	0,00 c	1,58 b	1,84 b	4,17 b
Filme	35,00 a	70,83 b	2,12 ab	2,95 a	16,67 b
Fita	5,00 b	95,83 a	2,71 a	3,47 a	70,83 a
Tratamento	Subcultivo 2		Subcultivo 3		
	Vigor	RM	Vigor	RM	MS
Tampa	1,25 b	8,33 c	1,59 a	12,50 b	0,033 ab
Filme	1,63 ab	45,83 b	0,79 b	39,58 b	0,021 b
Fita	2,29 a	95,83 a	1,92 a	95,83 a	0,056 a

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Ao se analisar o vigor das plantas (Figura 2), o uso de fita na vedação dos tubos de ensaio foi superior quando comparado ao uso de tampas, nos subcultivos 1 e 2. No cultivo inicial, a menor taxa de clorose foi observada com o uso de fita. Quanto ao número de brotações, no subcultivo 2, o uso de filme e fita foram superiores às tampas.

Para a característica rebaixamento do meio de cultura, maiores taxas foram observadas para vedação com fita, indicando que a fita microporosa proporciona maior troca gasosa com o meio externo ao tubo, permitindo também, evaporação do meio de cultura. Maior massa seca foi obtida com o uso de fita, o que pode indicar melhor uso dos compostos do meio de cultura com o uso deste tipo de vedação, podendo ser uma das causas do rebaixamento do meio de cultura.



**Figura 2.** Classificação do vigor de brotações de *Eremanthus incanus* em função dos tipos de vedação dos tubos de ensaio. 0) oxidado, 1) ruim, 2) médio e 3) bom.

**Figure 2.** Classification of the shoot vigor of *Eremanthus incanus* depending on the types of sealing of the test tubes. 0) oxidized, 1) bad, 2) medium and 3) good.

Para o percentual de clorose, houve grande variação dentro dos tratamentos, observada nos altos valores dos coeficientes de variação, atingindo o valor de 99,53% no subcultivo 1. As demais características avaliadas em todos os experimentos apresentaram coeficientes de variação mais baixos, variando entre 10,27 e 49,79%. É comum observar, neste tipo de experimento, coeficientes de variação experimental um pouco mais altos, pois utiliza-se de plântulas recém germinadas e com grande variação genética (MOURA et al., 2012). A variação é justificada pelo fato das sementes utilizadas não possuírem nenhum grau de melhoramento, bem como de possíveis diferenças nas condições fisiológicas dos explantes.

O ambiente fechado, ao qual os explantes são submetidos, proporciona, de modo geral, o acúmulo de etileno, que, mesmo em pequenas concentrações, pode ser fisiologicamente ativo e desencadear vários processos, positiva ou negativamente (DONINI et al., 2011; SÁ et al., 2012).

Segundo Saldanha et al. (2012), o uso de membrana permeável em substituição a um sistema fechado conduziu a um maior crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata* cultivadas *in vitro*. Rodrigues et al. (2011) obtiveram aumento da qualidade de brotos para *Azadirachta indica*, diminuindo a ocorrência de clorose e senescência foliar com o uso de membranas porosas, concluindo que o uso dessas membranas pode influenciar positivamente o estabelecimento da cultura devido ao aumento na troca de gás, não acumulando gás etileno no interior dos frascos.

Em estudos com mangabeira, Sá et al. (2012) obtiveram mais brotações com uso de Para-film® e filme PVC em comparação com tampa plástica e papel alumínio para vedação de frascos. Neste mesmo trabalho, o tratamento usando filme PVC também induziu maior redução do meio de cultura.

## CONCLUSÕES

A multiplicação via gemas axilares de *Eremanthus incanus* é influenciada pelo meio de cultura, pelos reguladores de crescimento BAP e ANA e pela forma de vedação dos tubos de ensaio.

Os melhores resultados de multiplicação de gemas foram obtidos com o uso do meio MS 100% e com a combinação de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

Os tubos de ensaio vedados com fita microporosa possibilitaram melhor desenvolvimento dos explantes *in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, A. B. A.; PALLELAR, P.; RAO, A. S.; RAO, M. V.; TAHA, R. M. Optimized conditions for callus induction, plant regeneration and alkaloids accumulation in stem and shoot tip explants of *Phyllanthus nodiflorus*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, v. 9, n. 4, p. 1262-1270, 2011.
- BRONDANI, G. E.; HANSEL, F. A.; DUTRA, L. F.; WENDLING, I. Desinfestação e meio de cultura para o Estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Liquidambar styraciflua*. *Floresta*, Curitiba, v. 40, n. 3, p. 541-554, 2010.
- CORDEIRO, G. M.; BRONDANI, G. E.; OLIVEIRA, L. S.; ALMEIDA, M. Meio de cultura, BAP e ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus globulus* Labill. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, v. 42, n. 103, p. 337-344, 2014.
- COSTA, G. M.; NEPOMUCENO, C. F.; SANTANA, J. R. F. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 5, p. 1090-1096, 2010.
- CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C.; CHU, C. Y.; BI, F. Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica*, v. 18, p. 659-668, 1975.
- DAVIDE, A. C.; MELO, L. A. Produção de mudas de candeia. In: SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. **O manejo sustentável da candeia: o caminho de uma nova experiência florestal em Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2012, p. 43-60.
- DISARZ, R.; CORDER, M. P. M. Multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnsii* de Wild. sob diferentes meios de cultura. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 599-606, 2009.
- DONINI, L. P.; FIGUEIREDO, G. S.; SCHUCH, M. W. Nitrato de prata e diferentes tipos de vedação na multiplicação *in vitro* de oliveira 'Arbequina'. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 41, n. 9, p. 1532-1535, 2011.
- EZEIBEKWE, I. O.; EZENWAKA, C. L.; MBAGWU, F. N.; UNAMBA, C. I. N. Effects of combination of different levels of Auxin (NAA) and Cytokinin (BAP) on *in vitro* propagation of *Dioscorea rotundata* L. (White Yam). *New York Science Journal*, v. 2, n. 5, p. 1-8, 2009.
- FERMINO JR., P. C. P.; PEREIRA, J. E. S. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith – Fabaceae). *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: Experimental Designs Package (Portuguese)**. R package version 1.1.2. 2013.
- FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Micropropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of South Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 64, n. 1, p. 1-4, 2001.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, v. 50, n.1, p. 151-158, 1968.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Springer, 2008, 501 p.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LÉON, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.

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

HORBACH, M. A.; BISOGNIN, D. A.; KIELSE, P. Q.; KENIA M.; FICK, T. A.; Micropropagação de plântulas de erva-mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 113-119, 2011.

HUBNER, H. I.; SILVA, L. V.; CAPATTI, I.; FUMAGALI, E.; SOUTO, E. R.; GONÇALVES, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. B. Multiplicação *in vitro* de *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg. (Apocynaceae). **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 29, n. 1, p. 63-66, 2007.

KOMALAVALLI, N.; RAO, M. V. *In vitro* micropropagation of *Gymnema sylvestre* – A multipurpose medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 61, p. 97-105, 2000.

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

LOEUILLE, B. *Eremanthus* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5316>>. Acesso em: 08 dez. 2014.

MELO, L. A.; DAVIDE, A. C.; TEIXEIRA, L. A. F. Metodologia para resgate de matrizes e enraizamento de estacas de *Eremanthus erythropappus*. **Cerne**, v. 18, n. 4, p. 631-638, 2012.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, Washington, v. 163, n. 3862, p. 85-87, 1969.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Étude des milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 78, p. 437-442, 1977.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 21 Jul. 2013.

RODRIGUES, M. R.; COSTA, T. H. F.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; SILVA, L. C. OTONI, W. C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v. 48, n. 1, p. 67-72, 2011.

ROSAL, L. F.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R. M. Micropropagation of the medicinal plant *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish. **HortScience**, Alexandria, v. 42, n. 6, p. 1420-1424, 2007.

SÁ, A. J.; LÉDO, A. S.; LÉDO, C. A. S.; PASQUAL, M.; SILVA, A. V. C.; SILVA JR., J. F. Sealing and explant types on the mangaba micropropagation. **Ciência agrotecnica**, v. 36, n. 4, p. 406-414, 2012.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L. F.; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M.; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 110, n. 3, p. 413–422, 2012.

SCHENK, R. V.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction of growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 50, n. 1, p. 199-204, 1972.

SCOLFORO, J. R. S.; LOEIULLE, B. F. P.; ALTOÉ, T. F. Caracterização da candeia. In: SCOLFORO, J. R. S.; OLIVEIRA, A. D.; DAVIDE, A. C. **O manejo sustentável da candeia: o caminhar de uma nova experiência florestal em Minas Gerais**. Lavras: UFLA, 2012, p. 19-27.

WERNER, E. T.; MILANEZ, C. R. D.; MENGARDA, L. H. G.; VENDRAME, W. A. CUZZUOL, G. R. F. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). *Acta Botânica Brasilica*, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 1046-1051, 2010.

WHITE, P. R. **The Cultivation of Animal and Plant Cells**. New York: Ronald Press, 1963, 228 p.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura Clonal: Princípios e Técnicas**. Viçosa: UFV, 2013, 279 p.

Recebido em 18/10/2015

Aceito para publicação em 21/06/2016