

# Micropropagação de *Alstroemeria* aff. *inodora* Através de Meristema Apical

EIDINETE A. QUIRINO<sup>1</sup>, ANTONIO FERNANDO C. TOMBOLATO<sup>1</sup> e GLÁUCIA M.B. AMBROSANO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Agronômico - IAC, Seção de Floricultura e Plantas Ornamentais,, Caixa Postal 28, 13001-970, Campinas (SP).

<sup>2</sup>Instituto Agronômico, Seção de Técnica Experimental e Cálculo.

## RESUMO

A micropropagação de *Alstroemeria* aff. *inodora* através de meristema apical de hastes vegetativas tornou-se possível adicionando-se ao meio MS diversas combinações de ANA (0,0; 0,02; 0,2 e 2,0 mg/l) e 6-BA (0,0; 2,0 e 10,0 mg/l). O melhor meio de cultura ainda está por ser definido, ficando demonstrada, através desses ensaios, a viabilidade de uma técnica simples de micropropagação, na qual a planta matriz não é destruída e o índice de contaminação é baixo, em contraposição à técnica, atualmente em uso, de micropropagação pelo rizoma subterrâneo.

**Palavras-chaves:** micropropagação, *Alstroemeria*, meristema, cultura in vitro.

## ABSTRACT

***Alstroemeria* micropropagation by shoot-tip.**

*Alstroemeria* aff. *inodora* (a Brazilian specie) micropropagation by vegetative stem shoot tip became possible on several assays where the MS medium was added with several combinations of NAA (0,0; 0,02; 0,2 e 2,0 mg/l) and 6-BA (0,0; 2,0 e 10,0 mg/l). The best culture medium is still to be established, but, by these trials, it is showed the viability of an easy micropropagation technique where the mother plant is not destructed and the contamination rate is very low.

**Key words:** micropropagation, *Alstroemeria*, shoot tip, tissue culture.

## 1. INTRODUÇÃO

O interesse agrônômico da alstroemeria, principalmente como flor de corte, tem sido crescente em nível mundial. Um dos motivos da expansão dessa cultura deve-se à evolução das técnicas de micropropagação que têm permitido a multiplicação rápida e em larga escala de novos cultivares selecionados.

Na bibliografia internacional não existe relato de micropropagação de qualquer espécie brasileira, como também não existe relato de sucesso na micropropagação via meristema apical de haste vegetativa. ZIV et al. (1973), na micropropagação de híbridos dos tipos Parigo e Ligtu, utilizaram como fonte de explante secções de hastes florais distanciadas de 1 a 2 mm do meristema apical. A regeneração foi obtida com o uso de 2 a 15 ppm de cinetina e, no máximo, 2 ppm de auxina, especialmente ANA (ácido-naftalenoacético). A alta concentração de auxina resultou na formação de raízes.

LIN e MONETTE (1987) inocularam ápices de rizoma, com e sem meristema de plântulas obtidas de semente, em meio MS suplementado com 0,22 M de Dglucose e 1,48 µM de vitamina B1. Os ápices de rizoma com meristema desenvolveram maior quantidade

de raízes em relação aos sem meristema. Houve maior regeneração de brotos em ambiente escuro, quando comparado a ambiente claro.

HAKKAART e VERSLUIJS (1988) também usaram ápices de rizoma de vários cultivares, observando, após seis a oito semanas, a formação de brotos que foram transferidos para um meio sem suplementação hormonal. O meio inicial não necessita de citocinina, apenas auxina, sendo que a adição de 0,5 a 5,0 mg/l de AIB (ácido 3-indolbutírico) promoveu os melhores resultados quando comparados com AIA (ácido 3-indolacético) e ANA. A formação de raízes ocorreu melhor em meio líquido.

PIERIK et al. (1988) utilizaram meristemas do rizoma em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) (macro e microelementos) + 25 mg/l de NaFeEdta + 30 g/l de sacarose + 2-4 mg/l de 6-BA + 0,4 mg/l de vitamina B1 e 7 g/l de ágar. Para o enraizamento a concentração de sacarose foi aumentada para 50 g/l, retirando-se o 6-BA (6-benzilaminopurina) e acrescentando-se 0,5 mg/l de ANA.

Uma das grandes dificuldades encontradas na micropropagação da *Alstroemeria* é a esterilização do meristema do rizoma que é dificultada pela grande quantidade de impurezas e microrganismos.

O processo de esterilização mais eficiente é obtido através de uma combinação dos métodos de RUFFONI (1991) e de PEDERSEN e BRANDT (1992), ou seja: - retirar a planta do solo três a cinco dias antes da inoculação *in vitro*, lavando-se bem as partes subterrâneas. Em seguida, passa-se por um tratamento com benomyl 1 g/l e streptomycina 100 mg/l por 15 minutos e, em um recipiente limpo contendo vermiculita ou perlita, são replantadas e mantidas em estufa; - no momento da cultura, esteriliza-se com hipoclorito de cálcio a 1% durante 10 minutos e retira-se a primeira escama. Em seguida, esteriliza-se

com solução de hipoclorito de cálcio a 1% durante 5 minutos, enxaguando-se por 3 vezes em água esterilizada.

A partir desses dados de revisão bibliográfica, instalaram-se diversos ensaios com meristema apical de hastes vegetativas de uma espécie nativa do Brasil, *Alstroemeria* aff. *inodora*, tendo como objetivo sua micropropagação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Nos dois ensaios apresentados a seguir, foram utilizadas, como fonte de explante, hastes vegetativas de *Alstroemeria* aff. *inodora*, com aproximadamente 3 cm de comprimento. Essas plantas estavam em cultivo em condições de telado a 70%.

### Ensaio 1

Para a esterilização, as hastes foram imersas por cinco segundos em álcool 70% e, posteriormente, esterilizadas em solução de hipoclorito de cálcio a 1% + 3 gotas de Tween 20 por 5 minutos, sendo em seguida enxaguadas por três vezes em água esterilizada. Passou-se à retirada dos primórdios foliares a olho nu, sem a necessidade de lupa, dado o tamanho dos explantes.

Os meristemas com aproximadamente 2 mm de comprimento foram inoculados em meio MS + 30g/l de sacarose + 100mg/l de hidrolisado de caseína + 1,5g/l de gelrite + interações entre o ANA (0,0; 0,02; 0,2 e 2,0 mg/l) e 6-BA (0,0; 2,0 e 10,0 mg/l). O pH do meio foi ajustado para 5.75 antes de se acrescentar o gelrite.

Após 70 dias de inoculação, os explantes foram avaliados e, em seguida, transferidos para meio MS sem reguladores de crescimento.

### Ensaio 2

O mesmo procedimento foi utilizado para o segundo ensaio, porém os explantes, após 70 dias, foram transferidos para meio

MS + 2mg/l de 6-BA + 0,01mg/l de ANA, devido à clorose que vinham apresentando os explantes dos tratamentos 2, 3 e 4, no ensaio 1.

Os ensaios foram mantidos em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, empregando-se uma lâmpada Gro-lux e uma lâmpada fluorescente de 20W por prateleira, com luminosidade aproximada de 1500 lux e temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

As seguintes medidas foram utilizadas para as avaliações: comprimento da parte aérea (cm); número de raízes e comprimento da raiz de maior tamanho (cm).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial com dois fatores 6-BA e ANA. O fator 6-BA foi estudado em três níveis (0,0; 2,0 e 10,0 mg/l) e ANA em quatro níveis (0,0; 0,02; 0,2 e 2 mg/l), com 15 repetições.

Para fins de análise de variância, a variável de número de raízes foi transformada em  $\sqrt{x + 0,5}$ . Em seguida, realizou-se a regressão polinomial para os diferentes níveis de ANA e 6-BA.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à semelhança dos resultados, apenas os dados do ensaio 1 encontram-se apresentados neste trabalho.

Tabela 1. Número de raízes produzidas nos tratamentos de combinações entre 6-BA e ANA (mg/l), no ensaio 1.

ANA	6-BA			média	F lin	F q.	R2
	0,0	2,0	10,0				
0,0	0,00	0,53	0,00	0,18	ns	ns	-
0,02	3,20	0,07	0,27	1,18	**	**	1,00
0,2	3,73	0,47	0,00	1,40	**	**	1,00
2,0	5,60	0,13	0,13	1,95	**	**	1,00
média	3,13	0,30	0,10				
F lin.	**	ns	ns				
F q.	**	ns	ns				
R2	0,51	-	-				

F lin. = teste F para regressão linear; F q. = teste F para regressão quadrática; ns = não significativo; \*\* = significativo ao nível de 1%

#### Número de raízes

Pelos resultados obtidos no ensaio 1 (Tabela 1), foi possível constatar que apenas na presença de ANA ocorreu o maior desenvolvimento das raízes, porém com elevada manifestação de clorose da parte aérea. Na presença de ANA houve estatisticamente um efeito quadrático para 6-BA no número de raízes, sendo que o número máximo de raízes foi obtido na ausência de 6-BA com 2,0 mg/l de ANA. Na presença de 6-BA não houve diferença entre as doses de ANA. Na ausência de ANA, não houve diferença entre as doses de 6-BA. No ensaio 2, o mesmo efeito quadrático foi observado para os tratamentos com ANA 0,2 mg/l e 2,0 mg/l sendo o maior número de raízes (5,07) encontrado na dose 0,2 mg/l.

#### Comprimento de raiz

Foi observado um efeito quadrático na interação de 6-BA para as concentrações de ANA entre 0,02 e 0,2 mg/l, no ensaio 1 (Tabela 2), ou seja, a presença do 6-BA afeta sensivelmente o crescimento das raízes. Houve diferença significativa entre as doses de 0,02 e 0,2 mg/l de ANA, com um efeito quadrático para 6-BA, sendo o maior comprimento de raiz obtido na ausência de 6-BA. No ensaio 2,

esse mesmo efeito foi observado apenas na dose de 0,2 mg/l. No ensaio 1, a adição de ANA no meio não apresentou nenhum efeito significativo, enquanto que no ensaio 2 houve efeito quadrático do ANA apenas na ausência de 6-BA, sendo que as raízes mais longas (média = 0,53 cm) foram observadas em 0,2 mg/l de ANA.

#### Parte aérea

No ensaio 1 (Tabela 3) houve um efeito quadrático de 6-BA nas doses 0,0 e 0,02 mg/l de ANA e linear crescente para os demais tratamentos, enquanto que no ensaio 2 o efeito foi quadrático para todas as doses de ANA. Dessa maneira, um equilíbrio ideal entre as concentrações de citocinina e auxina foi identificado, sendo que o maior desenvolvimento da parte aérea foi observado nas doses 0,02 mg/l de ANA e 2,0 mg/l de 6-BA e, respectivamente, nas doses 0,2 e 10,0 mg/l. A auxina ANA apresentou efeito linear para a dose de 2 mg/l de 6-BA e quadrático para 10mg/l, evidenciando que o pico para o maior comprimento da parte aérea encontra-se abaixo da dose de 2,0 mg/l de ANA. No ensaio 2 nenhum efeito foi constatado.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos tratamentos com 6-BA, houve um maior estímulo para o desenvolvimento da parte aérea e essa permaneceu durante todo o ensaio com uma coloração de verde intenso. Foi verificado que a adição de apenas ANA sem 6-BA proporciona o desenvolvimento de raízes, porém sem rizoma e com alta frequência de clorose, fato que leva à morte dos explantes. Nos tratamentos com 6-BA ou 6-BA + ANA houve maior desenvolvimento de parte aérea. Plantas completas foram observadas nos meios que continham ambos os reguladores de crescimento, porém sem definição de qual a melhor combinação entre eles.

Em ambos os ensaios, na ausência de fitoreguladores de crescimento, todos os explantes tornaram-se cloróticos e sem raiz.

Considerando-se os resultados obtidos, dentro das presentes condições experimentais, verifica-se que é possível propagar *Alstroemeria aff. inodora* por via de meristema de hastes jovens, fato jamais relatado na bibliografia. Como vantagens desse método pode-se citar: a não necessidade de destruição da planta matriz; o

Tabela 2. Comprimento da maior raiz (cm) nos tratamentos de combinações entre 6-BA e ANA (mg/l), no ensaio 1.

ANA	6-BA			média	F lin	F q.	R2
	0,0	2,0	10,0				
0,0	0,00	0,10	0,00	0,03	ns	ns	-
0,02	2,97	0,07	0,47	1,17	**	**	1,00
0,2	1,80	0,07	0,00	0,62	**	**	1,00
2,0	1,10	0,07	0,07	0,41	ns	ns	-
média	1,48	0,08	0,13				
F lin.	ns	ns	ns				
F q.	ns	ns	ns				
R2	-	-	-				

F lin. = teste F para regressão linear; F q. = teste F para regressão quadrática; ns = não significativo; \*\* = significativo ao nível de 1%.

Tabela 3. Comprimento da parte aérea (cm) nos tratamentos de combinações entre 6-BA e ANA (mg/l), no ensaio 1.

ANA	6-BA			média	F lin	F q.	R2
	0,0	2,0	10,0				
0,0	0,50	7,73	7,50	5,24	**	**	1,00
0,02	1,83	9,70	4,73	5,42	ns	**	1,00
0,2	1,90	6,23	9,47	5,87	**	ns	0,83
2,0	2,43	3,00	6,17	3,87	**	ns	0,99
média	1,67	6,67	6,97				
F lin.	ns	**	ns				
F q.	ns	ns	**				
R2	-	0,81	0,59				

F lin. = teste F para regressão linear; F q. = teste F para regressão quadrática; ns = não significativo; \*\* = significativo ao nível de 1%.

índice de contaminação baixo e a dispensa da lupa durante a fase de inoculação, tornando-se uma técnica de fácil execução.

### LITERATURA CITADA

- HAKKAART, F. A. & VERSLUIJS, J. M. A. Virus elimination by meristem tip culture from a range of *Alstroemeria* cultivars. *Neth. J. Pl. Path*, Wageningen, v.94, p.49-56, 1988.
- LIN, W. C. & MONETTE, P. L. In vitro propagation of *Alstroemeria* 'Alsaan'. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 9, p.29-35, 1987.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- PEDERSEN, CH. & BRANDT, K. A. Method for disinfection of underground rhizome tips of *Alstroemeria* and *Heliconia*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FLOWERBULBS, 6; Skierniowice Polonia. 1992. Research Institute of Pomology and Floriculture. *Programme & Abstracts...* 1992. p.111.
- PIERIK, R.L.M; van VOORST, A.; BOVY, G.; van LELIVELT, C.C.C. & WIT, J. C. Vegetative propagation of *Alstroemeria hybrids* in vitro. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v.226, p.8189, 1988.
- RUFFONI, B. Sperimenti di micropropagazione in *Alstroemeria*. In: GIORNATA DI STUDI SU ALSTROEMERIA. Sanremo, Itália. *Anais...* p.7380. 1991.
- ZIV, M.; KANTEROVITZ, R. & HALEVY, A. H. Vegetative propagation of *Alstroemeria* in vitro. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.1, p.271-277, 1973.