

# **UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**CULTIVO *IN VITRO* E ESTAQUIA DE *Ginkgo biloba* L.**

**PALOMA ALVES DA SILVA SEXTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, dezembro de 2005

# **UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**CULTIVO *IN VITRO* E ESTAQUIA DE *Ginkgo biloba* L.**

**PALOMA ALVES DA SILVA SEXTO**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. PhD. Magali Ferrari Grandó**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Augusto Nienow**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, dezembro de 2005

CIP – Catalogação na Publicação

---

S518c    Sexto, Paloma Alves da Silva  
          Cultivo in vitro e estaquia de Ginkgo biloba L. /  
          Paloma Alves da Silva Sexto. – 2005.  
          191 f. : il. color. ; 30 cm.

          Orientação: Profª PhD. Magali Ferrari Grando.  
          Co-orientação: Profº Dr. Alexandre Augusto Nienow.  
          Dissertação (Mestrado em Agronomia) –  
          Universidade de Passo Fundo, 2005.

          1. Ginkgo – Cultivo. 2. Ginkgo – Propagação por  
          estaquia. 3. Plantas ornamentais – Fertilização in vitro.  
          I. Grando, Magali Ferrari, orientadora. II. Nienow,  
          Alexandre Augusto, orientador. III. Título.

          CDU: 635.9

---

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569



## **DEDICO**

*À meus pais Carmen e João Sidney, pelo amor, amizade, compreensão, dedicação, auxílio na realização de minhas conquistas e principalmente por serem meus progenitores.*

*À meus irmãos Tatiana e Tevie, pelo amor, amizade, apoio e companheirismo.*

*À meus cinco maninhos, pelos momentos felizes passados juntos a cada retorno para casa.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade de Passo Fundo, pela oportunidade de realizar este curso.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Magali Ferrari Grandó, pela orientação, dedicação, amizade, compreensão e paciência.

Ao Professor Alexandre Augusto Nienow, pelo aprendizado, apoio e estímulo.

Ao Professor Delvino Nolla, pela amizade e ensinamentos transmitidos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF, em especial Professora Lizete Augustin,

Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>. Marilei Suzin, Clarício Machado dos Santos, Abrelino Oliveira e Marizete Zanin, pela amizade, convívio, apoio, paciência e disponibilidade na realização deste trabalho.

Aos Professores Erlei de Melo Reis, Norimar D'ávila Denardin e Gerson Lucas Fortes, pelo auxílio e contribuição ao trabalho.

À Professora Dileta Cecchetti, pela assistência fundamental na estatística.

Ao Engenheiro Florestal Nilton César Mantovani, pelas valiosas sugestões durante a escrita desta dissertação.

Ao Professor Roberto Luiz Salet, pela amizade, incentivo, ensinamentos e a oportunidade de ter chegado até aqui.

À Professora Ana Paula Pellegrino, pelo aprendizado e colaboração deste trabalho.

Aos Biólogos do Laboratório de Cultura de Tecidos da UNICRUZ Janieli Perotti, Diego Golle e o estagiário Henrique Beutler, pela amizade e aprendizagem inicial.

Aos estagiários da FAMV/UPF Adrimara Isabel Radin, Luciana Camargo, Caetano Diehl, Guilherme Meira e Pedro Mattjie, pela amizade, ajuda e disponibilidade.

Às amigas de Cruz Alta Taís Barbosa, Taiana Moura Jappe e Verônica Lemos, pela amizade e ombro amigo em todos os momentos necessários.

Aos amigos de Passo Fundo Helena Calixto, Madelaine Varnier, Rita Maroso e família, Tanaka Parreira, Karinne Baréa, Kalíbia Jane Pereira, Sabrina Brum, Roseana Stolte, Daniela Fávero, Simone Felizari, Jucenara Soares e Odirce Antunes, pelo exemplo de

amizade, coleguismo e incentivo nos momentos alegres e difíceis desta caminhada.

Ao médico Dr. Antônio Augusto De Bem e aos fisioterapeutas Aline Dors e João Bevilacqua, pelo atendimento e tratamentos médico e fisioterapêutico prestados nos momentos que mais precisei, fundamentais para meu pleno restabelecimento e conclusão desta etapa.

E principalmente a Deus, pela realização de mais um sonho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Lista de Tabelas .....	viii
Lista de Figuras .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	01
<b>ABSTRACT</b> .....	03
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	05
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	07
2.1 Origem, história e botânica da <i>Ginkgo biloba</i> .....	07
2.2 Propagação e reprodução .....	10
2.3 Uso terapêutico .....	11
2.4 Cultura de tecidos .....	14
2.4.1 Micropropagação .....	15
2.4.2 Processos morfogênicos <i>in vitro</i> .....	18
2.4.3 Meios de cultura .....	23
2.4.3.1 Reguladores de crescimento .....	25
2.4.4 Micropropagação de espécies lenhosas .....	28
2.4.4.1 Fase de estabilização .....	31
2.4.4.2 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Ginkgo biloba</i> .....	32

2.4.5	Microrganismos <i>in vitro</i> .....	35
2.5	Propagação por estaquia .....	38
2.5.1	Bases anatômicas e fisiológicas do enraizamento	40
2.5.2	Principais fatores que afetam o enraizamento .....	42
2.5.2.1	Fatores endógenos .....	42
2.5.2.2	Fatores ambientais .....	50

**CAPÍTULO I**  
**CULTIVO *IN VITRO* DE ÁPICES CAULINARES E**  
**SEGMENTOS NODAIS DE *Ginkgo biloba* L. EM**  
**DIFERENTES MEIOS DE CULTURA**

<b>Resumo</b> .....	53
<b>Abstract</b> .....	56
<b>1 Introdução</b> .....	59
<b>2 Material e métodos</b> .....	62
2.1 Experimento I .....	63
2.1.1 Cultivo de ápices caulinares e segmentos nodais de matriz jovem de <i>Ginkgo biloba</i> em diferentes meios de cultura .....	63
2.2 Experimento II .....	66
2.2.1 Cultivo de ápices caulinares e segmentos nodais de matriz adulta de <i>Ginkgo biloba</i> em diferentes meios de cultura .....	66
<b>3 Resultados e discussão</b> .....	68
3.1 Experimento I .....	68
3.2 Experimento II .....	85
<b>4 Conclusões</b> .....	92

**CAPÍTULO II**  
**REGULADORES DE CRESCIMENTO, ADITIVOS**  
**NUTRICIONAIS E MEIOS BÁSICOS NO CULTIVO**  
***IN VITRO* DE ÁPICES CAULINARES DE *Ginkgo***  
***biloba* L.**

<b>Resumo</b> .....	94
<b>Abstract</b> .....	97
<b>1 Introdução</b> .....	100

<b>2 Material e métodos</b> .....	101
2.1 Experimento I .....	102
2.1.1 Cultivo de ápices caulinares de matriz jovem de <i>Ginkgo biloba</i> em diferentes meios de cultura suplementados com reguladores de crescimento e aditivos nutricionais .....	102
2.2 Experimento II .....	107
2.2.1 Cultivo de ápices caulinares de matriz jovem de <i>Ginkgo biloba</i> em dois meios de cultura na ausência de reguladores de crescimento e aditivos nutricionais .....	107
<b>3 Resultados e discussão</b> .....	109
3.1 Experimento I .....	109
3.2 Experimento II .....	126
<b>4 Conclusões</b> .....	135

**CAPÍTULO III  
PROPAGAÇÃO DA *Ginkgo biloba* L. POR  
ENRAIZAMENTO DE ESTACAS SEMILENHOSAS E  
USO DO AIB**

<b>Resumo</b> .....	137
<b>Abstract</b> .....	139
<b>1 Introdução</b> .....	141
<b>2 Material e métodos</b> .....	144
<b>3 Resultados e discussão</b> .....	149
<b>4 Conclusões</b> .....	157
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	158
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	161
<b>APÊNDICES</b> .....	176

## LISTA DE TABELAS

## REVISÃO DE LITERATURA

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Variações dos ginkgolides A, B e C quanto às posições na estrutura química das trilactonas terpênicas indicadas na figura 3a. (Fonte: GbEXTRACT, 2005) .....	13

## CAPÍTULO I

1	Combinções de reguladores de crescimento em meio básico WPM para cultivo de ápices caulinares e segmentos nodais de <i>Ginkgo biloba</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003 .....	65
2	Combinções de reguladores de crescimento em meio básico WPM para cultivo de ápices caulinares e segmentos nodais de <i>Ginkgo biloba</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003 .....	68
3	Diâmetro inicial e final (cm) dos calos organogênicos de <i>Ginkgo biloba</i> avaliados aos 30 e 60 dias de cultivo em diferentes tratamentos no meio WPM. Passo Fundo-RS, FAMV/UPF, 2003 ..	81
4	Diâmetro inicial e final (cm) dos calos organogênicos de <i>Ginkgo biloba</i> avaliados aos 30 e 60 dias de cultivo em diferentes tratamentos no meio WPM. Passo Fundo-RS, FAMV/UPF, 2004 ..	92

## CAPÍTULO II

1	Combinções de reguladores de crescimento e aditivos nutricionais em meio básico MS para cultivo de ápices caulinares de <i>Ginkgo biloba</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 .....	105
2	Composição dos meios de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD e McCOWN, 1980). FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 .....	108
3	Número de gemas formadas por calo organogênico de <i>Ginkgo biloba</i> aos 30 e 60 dias de cultivo em diferentes tratamentos no meio MS. Passo Fundo-RS, FAMV/UPF, 2004 .....	119
4	Peso inicial e final (mg) dos calos organogênicos de <i>Ginkgo biloba</i> aos 30 e 60 dias de cultivo em	

	diferentes tratamentos no meio MS. Passo Fundo-RS, FAMV, 2004 .....	124
<b>5</b>	Frequência de brotação, comprimento médio das brotações e número médio de folhas em ápices caulinares de <i>Ginkgo biloba</i> nos meios de cultura MS e WPM aos 30 dias de cultivo. Passo Fundo-RS, FAMV, 2005 .....	129
<b>6</b>	Comprimento médio das brotações, número médio de folhas e gemas em ápices caulinares de <i>Ginkgo biloba</i> nos meios de cultura MS e WPM aos 60 dias de cultivo. Passo Fundo-RS, FAMV, 2005 .....	132

### CAPÍTULO III

<b>1</b>	Porcentagem de estacas apicais e basais vivas brotadas de <i>Ginkgo biloba</i> , com e sem tratamento de AIB. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 .....	151
<b>2</b>	Porcentagem de estacas apicais e basais vivas enraizadas de <i>Ginkgo biloba</i> , com e sem tratamento de AIB. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 .....	154
<b>3</b>	Porcentagem de estacas apicais e basais vivas não enraizadas de <i>Ginkgo biloba</i> , com e sem tratamento de AIB. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 .....	156

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Aspectos botânicos da <i>Ginkgo biloba</i> . a) Árvore; b) folha bilobulada; c) folhas formadas em brotações de ramos longos; d) folhas formadas em brotações de ramos curtos. (Fonte: FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003; THE GINKGO PAGES, 2004) ...	09
<b>2</b>	Sementes de <i>Ginkgo biloba</i> . a) Ramo de uma árvore feminina de <i>Ginkgo biloba</i> com sementes formadas; b) vista geral das sementes de <i>Ginkgo biloba</i> ; c) semente cortada longitudinalmente. Santa Maria-RS, 2003 .....	11
<b>3</b>	Estrutura química dos constituintes do extrato de	

folha padronizado de <i>Ginkgo biloba</i> - EGb 761. a) ginkgolides A, B e C; b) bilobalides; c) quercetina; d) kaempferol; e) isoharmnetina. (Fonte: GbEXTRACT, 2005) .....	12
--	----

## CAPÍTULO I

<b>1</b> Material vegetal de <i>Ginkgo biloba</i> . a) Planta matriz cultivada na FAMV/UPF; b) segmento de 1,5 cm de comprimento contendo uma gema axilar. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003 .....	63
<b>2</b> Árvore adulta feminina de <i>Ginkgo biloba</i> utilizada como matriz. Santa Maria-RS, 2003 .....	67
<b>3</b> Formação de brotos e folhas em ápices caulinares de <i>Ginkgo biloba</i> cultivados em meio WPM sem reguladores de crescimento aos 30 dias de cultivo. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003 .....	69
<b>4</b> Calo aquoso de <i>Ginkgo biloba</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003 .....	73
<b>5</b> Calos organogênicos de <i>Ginkgo biloba</i> obtidos em meio WPM na presença de reguladores de crescimento. a) calo nodular de coloração verde clara; b-c) calos com nódulos meristemáticos de coloração verde-escura; d) calo com formação de folhas. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003 .....	73
<b>6</b> Porcentagem de calos aquosos, organogênicos e necrosados formados a partir de ápices caulinares de <i>Ginkgo biloba</i> aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes tratamentos do meio WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003 .....	75

<b>7</b>	Calos organogênicos de <i>Ginkgo biloba</i> observados aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> no tratamento 3 (a e b) e no tratamento 6 (c). FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003 .....	76
<b>8</b>	Porcentagem de calos aquosos, organogênicos e necrosados formados a partir de ápices caulinares de <i>Ginkgo biloba</i> aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes tratamentos do meio WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003 .....	79
<b>9</b>	Calos organogênicos de <i>Ginkgo biloba</i> induzidos no meio WPM suplementado com 2 mgL <sup>-1</sup> de BAP (tratamento 5), observados aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	80
<b>10</b>	Porcentagem de perdas de unidades experimentais por necrose ao longo dos subcultivos de calos organogênicos de <i>Ginkgo biloba</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003 .....	82
<b>11</b>	Contaminações fúngicas em segmentos nodais de <i>Ginkgo biloba</i> aos cinco dias de cultivo. a) contaminação em 100 % das unidades experimentais; b) segmento nodal contaminado mostrando abertura e desenvolvimento das folhas; c) contaminação por fungo <i>Alternaria</i> ; d) contaminação por fungo <i>Fusarium</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003 .....	84
<b>12</b>	Calo aquoso de <i>Ginkgo biloba</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 .....	87
<b>13</b>	Calos organogênicos de <i>Ginkgo biloba</i> . a) calo inicial verde claro; b) calo verde-escuro com gemas. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 .....	88

14	Porcentagem de calos aquosos e organogênicos formados a partir de ápices caulinares de <i>Ginkgo biloba</i> aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes tratamentos do meio WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 .....	89
15	Porcentagem de calos aquosos e organogênicos formados a partir de ápices caulinares de <i>Ginkgo biloba</i> aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em diferentes tratamentos do meio WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 .....	90
16	Calos organogênicos de <i>Ginkgo biloba</i> . a) calo obtido no tratamento 5 (2BAP); b) calo obtido no tratamento 6 (2BAP+0,1ANA). FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 .....	92

## CAPÍTULO II

1	Tratamento fitossanitário na planta matriz de <i>Ginkgo biloba</i> com oxiclureto de cobre. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 .....	102
2	Material utilizado como explante de <i>Ginkgo biloba</i> . a) estacas de <i>Ginkgo biloba</i> com 15 cm de comprimento; b) segmentos de 1,5 cm de comprimento para retirada de ápices caulinares. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 .....	103
3	Calos de <i>Ginkgo biloba</i> induzidos após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento e aditivos nutricionais. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 .....	110
4	Calos organogênicos de <i>Ginkgo biloba</i> obtidos em	

- meio MS na presença de reguladores de crescimento e aditivos nutricionais. a) calo nodular de coloração verde clara; b) calo com nódulos meristemáticos de coloração verde-escura; c) calo com indução de gemas; d) calo com formação de folhas. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 ..... 111
- 5** Porcentagem de calos organogênicos e necrosados obtidos de ápices caulinares de *Ginkgo biloba* cultivados em diferentes meios de cultura por 30 dias. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 ..... 113
- 6** Porcentagem de calos organogênicos e necrosados de *Ginkgo biloba* observados aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes tratamentos do meio MS. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 ..... 116
- 7** Calos organogênicos de *Ginkgo biloba* com formação de gemas nos tratamentos 2 e 3 (MS+1BAP+0,1ANA+Aa Norstog; MS+1BAP+0,1ANA+L-pro+CH) aos 30 dias de cultivo *in vitro*. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 ..... 120
- 8** Calos organogênicos de *Ginkgo biloba* com formação de folhas nos tratamentos 6 e 9 (MS+1BAP+1AIA+L-pro+CH; MS+1CIN+1AIA+L-pro+CH) aos 30 dias de cultivo *in vitro*. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 ..... 122
- 9** Aspecto geral dos calos necrosados de *Ginkgo biloba*. a) calo organogênico parcialmente necrosado aos 30 dias de cultivo; b) calo necrosado aos 60 dias de cultivo. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 ..... 123

- 10** Aspectos dos ápices caulinares de *Ginkgo biloba* aos 15 dias de cultivo em meio de cultura WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2005 ..... 127
- 11** Aspecto do desenvolvimento dos ápices caulinares de *Ginkgo biloba* e formação de brotações aos 15 dias de cultivo. a) Meio de cultura MS; b) meio de cultura WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2005 127
- 12** Ápices caulinares de *Ginkgo biloba* desenvolvidos aos 30 dias de cultivo no meio MS. a) Início da formação de brotação; b) brotação mostrando o início da expansão de duas folhas. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2005 ..... 129

### CAPÍTULO III

- 1** Estufa dotada de sistema de irrigação por nebulização, utilizada na pesquisa. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 ..... 144
- 2** Árvore matriz de *Ginkgo biloba* localizada no viveiro comercial Rosiflor, em Ijuí, RS, 2004 ..... 145
- 3** Estacas de *Ginkgo biloba* coletadas da planta matriz. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 ..... 146
- 4** Estacas de *Ginkgo biloba* em bandejas de isopor contendo como substrato casca de arroz carbonizada. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 . 148
- 5** Vista parcial do experimento em estufa de nebulização com o sistema ativado. FAMV/UPF,

	Passo Fundo-RS, 2004 .....	149
6	Brotação das estacas apicais de <i>Ginkgo biloba</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.....	150
7	Brotação das estacas basais de <i>Ginkgo biloba</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 .....	152
8	Estacas apicais e basais mortas de <i>Ginkgo biloba</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 .....	152
9	Enraizamento de estacas de <i>Ginkgo biloba</i> . FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004 .....	154

#### CULTIVO *IN VITRO* E ESTAQUIA DE *Ginkgo biloba* L.

**Paloma Alves da Silva Sexto<sup>1</sup>; Magali Ferrari Grandó<sup>2</sup>; Alexandre Augusto Nienow<sup>3</sup>; Delvino Nolla<sup>4</sup>**

**RESUMO** - *Ginkgo biloba* (*Ginkgo biloba* L.) é uma espécie ornamental originária da China e tem despertado o interesse científico

---

<sup>1</sup> Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>., Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

<sup>2</sup> Orientadora, Bióloga, Ph.D., professora de Genética, Biotecnologia e Biologia Molecular da FAMV-ICB/UPF.

<sup>3</sup> Co-orientador, Eng. Agr., Dr., professor de Fruticultura e Silvicultura da FAMV/UPF.

<sup>4</sup> Eng. Agr., M.Sc., professor de Plantas Medicinais da FAMV/UPF.

no Ocidente, em função da sua capacidade de sintetizar compostos químicos, como ginkgolides e bilobalide, úteis no tratamento de diversas doenças. A dioícia, a dormência das sementes fora do seu habitat original e o baixo número de exemplares disponíveis no Brasil, são alguns dos fatores limitantes que justificam o desenvolvimento de técnicas como a cultura de tecidos e estaquia para sua multiplicação. Visando estudar o comportamento da *Ginkgo biloba* durante o cultivo *in vitro* e estaquia, foram realizados cinco experimentos onde foram avaliadas as respostas morfogênicas e o desenvolvimento dos ápices caulinares e segmentos nodais cultivados em diferentes meios de cultura, bem como o potencial de enraizamento de estacas semilenhosas utilizando diferentes concentrações do regulador de crescimento AIB (ácido indolbutírico). Não foi possível estabelecer o cultivo *in vitro* a partir de segmentos nodais devido a elevadas contaminações fúngicas. Os ápices caulinares cultivados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD e McCOWN, 1980) sem reguladores de crescimento apresentaram o desenvolvimento de brotações a partir os meristemas pré-existent, sendo que o meio MS induziu maior frequência de brotações e número de folhas/explante. Meios suplementados com reguladores de crescimento benzilaminopurina (BAP 0, 0,5 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>), cinetina (CIN 0, e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) combinados com ácido naftalenoacético (ANA 0 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>) e ácido indolacético (AIA 0 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) e ácido giberélico (GA<sub>3</sub> 0 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>), suplementados ou não com aditivos nutricionais, induziram a produção de calos em 100 % dos ápices caulinares. A frequência de calos organogênicos, bem como a sobrevivência dos mesmos foi influenciada pela composição do meio

de cultura, sendo a combinação de KIN+AIA+L-prolina+caseína hidrolizada positiva para a indução deste tipo de calo. No experimento realizado com estaquia, o enraizamento obtido nas três doses de AIB testadas, foi de 2,5 %.

**Palavras-chave:** Micropropagação, Meio de cultura, Calogênese, Enraizamento, Reguladores de crescimento.

### ***IN VITRO* CULTURE AND CUTTING OF *Ginkgo biloba* L.**

**Paloma Alves da Silva Sexto<sup>1</sup>; Magali Ferrari Grando<sup>2</sup>; Alexandre Augusto Nienow<sup>3</sup>; Delvino Nolla<sup>4</sup>**

**ABSTRACT** - *Ginkgo biloba* is an ornamental specie originated from China and has called scientific attention in the west due to the production of chemical compounds as ginkgolides and bilobalide,

---

<sup>1</sup> Agronomist, Master student in Agronomy Graduation Program, Major in Plant Production at Department of Agronomy and Veterinarian Medicine – University of Passo Fundo (FAMV/UPF).

<sup>2</sup> Adviser, Biologist, Ph.D., professor of Genetics, Biotechnology and Molecular Biology, FAMV-ICB/UPF.

<sup>3</sup> Co-adviser, Agronomist, Dr., professor of Fruit and Silviculture, FAMV/UPF.

<sup>4</sup> Agronomist, M.Sc., professor of Herbal plants, FAMV/UPF.

useful in the treatment of various diseases. The dioecious, the dormancy of the seeds out of their original habitat and the low number of samples available in Brazil, are the limitative factors that justify the development of techniques like the tissue culture and cutting for its multiplication. Aiming to study the behavior of *Ginkgo biloba* during the *in vitro* culture and cutting it were carried out five experiments being evaluated the morphogenesis responses and the development of shoot-tips and nodal segments cultured in different culture media; as well the potential rooting of semi hardwood cuttings using different concentrations of growth regulator IBA (indolbutyric acid). It was not possible to establish the *in vitro* culture from nodal segments due to high rate of fungi contamination. The shoot-tips cultivated on media MS (MURASHIGE and SKOOG, 1962) and WPM (LLOYD and McCOWN, 1980) without growth regulator presented the development of shoots from pre-existing shoot-tips, and the MS medium induced higher frequency of shooting and larger number of leaves/explant. Culture media supplemented with the benzilanimopurine (BAP 0, 0.5 1.0 and 2.0 mg L<sup>-1</sup>), kinetin (KIN 0 and 1.0 mg L<sup>-1</sup>), naftalenoacetic acid (NAA 0 and 0.1 mg L<sup>-1</sup>), indolacetic acid (IAA 0 and 1.0 mg L<sup>-1</sup>) and giberelic acid (GA<sub>3</sub> 0 and 0.5 mg L<sup>-1</sup>) growth regulators, combined or not with the nutritional addicts, promoted the induction of organogenic callus in 100 % of the shoot-tips cultured. The frequency of organogenic calli, as well the survival of them, were influenced by the composition of the medium, and the combination of KIN+AIA +L-proline+casein hydrolyzed was positive to the induction of this type of callus. In the experiment made

with cuttings, the rooting obtained in the 3 doses of IBA tested was 2,5 %.

**Key words:** Micropropagation, Culture media, Calogenesis, Rooting, Growth regulators.

## 1 INTRODUÇÃO

*Ginkgo biloba* é considerada uma importante árvore ornamental e medicinal devido a beleza e produção de inúmeros compostos químicos de importância farmacêutica (VAN BEEK et al., 1997). Suas folhas são as únicas que sintetizam certos tipos de terpenos, como ginkgolides e bilobalide, essenciais para o tratamento de diversas doenças (BALZ et al., 1999), entre elas insuficiência cerebrovascular, demência, Mal de Alzheimer, problemas circulatórios, renais, perda auditiva e visual e doenças cardíacas, sendo também muito útil na inativação de radicais livres (LICHTBLAU et al., 2002).

Entre os fatores que justificam o desenvolvimento de técnicas de propagação vegetativa em *Ginkgo biloba*, está o baixo número de exemplares no estado do Rio Grande do Sul, bem como o fato dessa espécie ser dióica e apresentar baixa taxa de germinação de sementes. O desenvolvimento de técnicas reprodutivas alternativas como a cultura de tecidos e a estaquia, poderiam viabilizar a produção comercial de mudas e a disponibilização de material vegetal para a indústria farmacêutica, que atualmente depende da importação.

As técnicas de micropropagação, utilizadas em plantas medicinais, dependem fundamentalmente dos objetivos da propagação e das características da planta (BAJAJ et al., 1988). Assim sendo, a micropropagação via processo de organogênese a partir do cultivo de ápices caulinares, calos, discos foliares ou segmentos nodais, foi estabelecida para várias espécies medicinais como a babosa, hipérico e calêndula, com a finalidade de obter plantas em escala para cultivo comercial. Em várias espécies, assim como para a ginkgo, as sementes apresentam sérios problemas com a germinação fora do seu habitat original (PEREIRA et al., 2000).

A propagação assexual por meio da estaquia, também é muito utilizada como um método de propagação viável a essas espécies (CORRÊA et al., 1997). Além disso, mantém a uniformidade e manutenção das características da planta-mãe (GARNER e CHAUDRHI, 1976 apud SANTANA, 2003).

Embora as técnicas de micropropagação e estaquia sejam eficientes para muitas espécies lenhosas, Montes-López e Rodríguez-de la O (2001) relatam que a *Ginkgo biloba* é uma espécie que tem demonstrado baixa capacidade de propagação vegetativa pelo

emprego destas tecnologias. Neste contexto, por não existirem protocolos eficientes de propagação que viabilizem a exploração econômica da espécie, há necessidade de desenvolver técnicas que potencializem sua produção através da micropropagação e estaquia.

Desta forma, o presente trabalho estudou o cultivo *in vitro* da *Ginkgo biloba* e a propagação por estaquia, visando estabelecer protocolos de propagação vegetativa desta espécie. Ápices caulinares e segmentos nodais, cultivados em diferentes meios de cultura, foram avaliados quanto as respostas morfogênicas e o desenvolvimento dos explantes. Pelo método da estaquia, o potencial de enraizamento de estacas semilenhosas foi estudado, utilizando diferentes concentrações do regulador de crescimento ácido indolbutírico (AIB).

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Origem, história e botânica da *Ginkgo biloba***

A origem da ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) é asiática, mais precisamente da China, sendo uma planta que se reproduz naturalmente em áreas de clima seco e temperado. Pertence à divisão Gimnospermae e a família Ginkgoaceae, sendo a última representante dessa família em extinção (TESKE, 1995). Essa planta faz parte há milênios do arsenal terapêutico chinês, no qual se faz menção há cerca de 2800 anos a.C..

A primeira descrição científica da árvore de ginkgo foi publicada em 1690, pelo botânico alemão Engelbert Kaempfer, que propôs o nome de Ginkyō, mas sua escrita era tão confusa que o "y" do Ginkyō, foi tomado como "g" (THE GINKGO PAGES, 2003).

Há possibilidade de ter havido confusão ao identificar ginkgo na literatura antiga. Um botânico inglês, em 1977, decidiu que o nome para a ginkgo dado por Linneus, *Ginkgo biloba*, era "bárbaro" e a renomeou para *Salisburia adiantifolia* Sm., o qual nunca se tornou reconhecido. Devido a algumas características de ginkgo serem semelhantes às das coníferas, esta espécie foi inicialmente incluído na família Taxaceae, sendo alterado depois para sua própria família, Ginkgoaceae (HUH & STABA, 1992).

Conforme Hobbs (1991), o nome ginkgo deriva da palavra chinesa "sankyo" ou "yin-kuo", significando "fruto de prata", como uma referência aos frutos produzidos pelas árvores fêmeas. A ginkgo também pode apresentar várias denominações como por exemplo, gincobiloba, ginkgobiloba, ginco biloba, gingobiloba, biloba, gingo biloba, gincko biloba ou ginkgo (VITABRASIL, 2005).

Ginkgo é uma das espécies de árvore mais antigas do planeta, única representante viva do seu gênero, cuja origem remonta ao período Mesosóico, cerca de 250 milhões de anos atrás e também relatos de sua existência na medicina chinesa há 5000 anos, por isso, é também chamada de "fóssil vivo" (LICHTBLAU et al., 2002).

A ginkgo quase se tornou extinta, mas atualmente está sendo cultivada e é comum encontrá-la nas ruas, principalmente na Ásia, fazendo parte da arborização urbana (HOBBS, 1991).

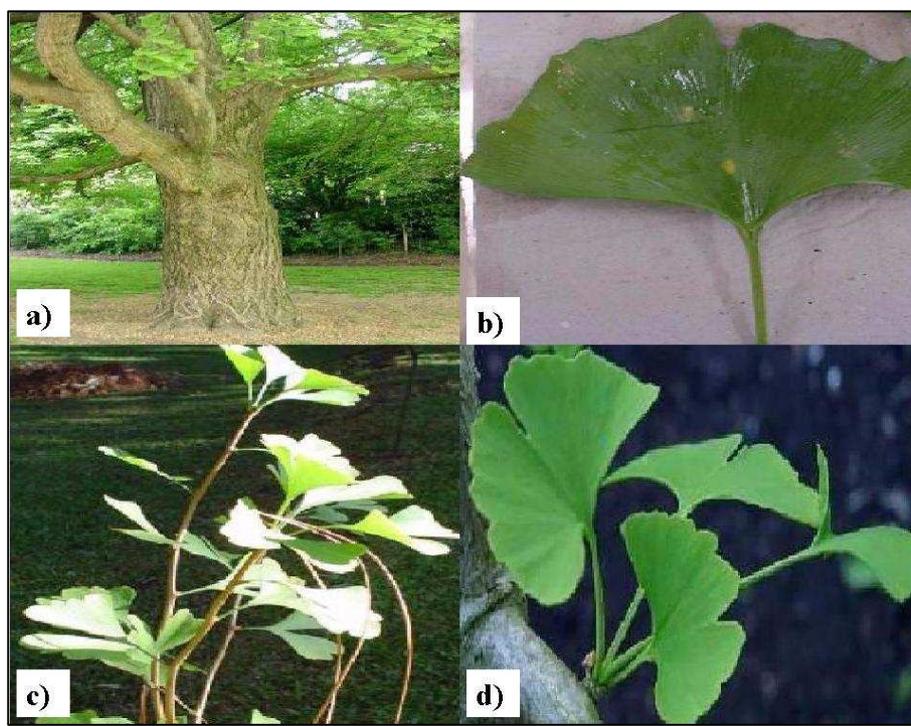
É uma espécie conhecida como planta ornamental em numerosos países de climas distintos, pois tem capacidade de se adaptar as mais diferentes condições ambientais (TESKE, 1995). Caracteriza-se por ser resistente à poluição e doenças (HOBBS, 1991), doenças estas causadas por bactérias e alguns tipos de vírus e fungos (BANOV, 1999).

No Ocidente, a ginkgo começou a ser estudada há cerca de quinze anos, sendo que seu uso cresceu muito desde 1994, quando o governo alemão aprovou um extrato padronizado das folhas dessa planta (EGb 761) para o tratamento da demência (FUGH-BERMAN & COTT, 1999).

A árvore de ginkgo possui casca de cor acinzentada e pode alcançar até 40 metros de altura, tendo caule reto, casca fendida e ramos tortuosos (USP, 2005) (Figura 1).

A coloração das folhas varia do verde-cáqui ao marrom-esverdeado, em forma de leque, bilobuladas, com 2 a 12 centímetros de largura e 2 a 9,5 centímetros de extensão (USP, 2005) (Figura 1).

As árvores apresentam forma cônica, como as coníferas, e exibem um interessante dimorfismo ramificado. Durante o primeiro ano de crescimento, brotos alongados são constituídos de folhas em



arranjo em espiral, separado por nódulos. Os brotos longos e maduros dão origem à "pequenos brotos", também chamados de brotos laterais. Folhas de cor verde-escura nascem em feixes no final de ambos os brotos longos e curtos a cada primavera (Figura1), as quais se tornam amarelo-douradas no outono, durante a senescência (HUH & STABA, 1992).

**Figura 1.** Aspectos botânicos da *Ginkgo biloba*. a) Árvore; b) folha bilobulada; c) folhas formadas em brotações de ramos longos; d) folhas formadas em brotações de ramos curtos. (Fonte: FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003; THE GINKGO PAGES, 2004).

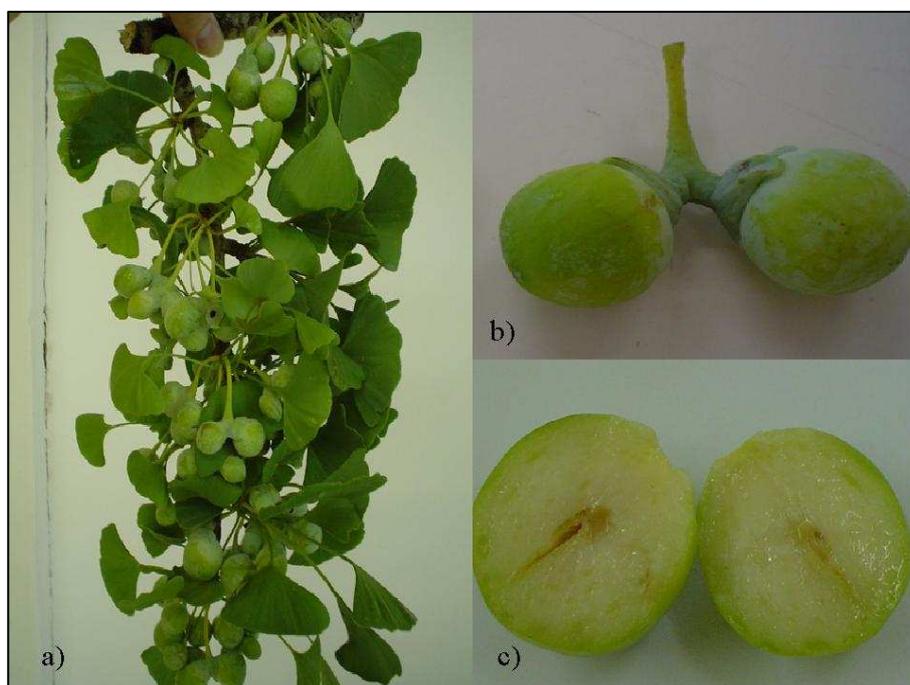
## 2.2 Propagação e reprodução

Segundo Hill (1985), no local de origem da planta, a maneira mais comum de propagação é através de sementes. Essas devem ser colhidas assim que amadurecem, não podendo estarem secas para serem limpas. A estratificação deve ser feita a 5°C, três meses antes do plantio.

A ginkgo apresenta algumas dificuldades de propagação, principalmente fora do seu habitat original, relacionadas à ausência de estágio de florescimento e ausência de planta do sexo oposto, visto ser uma espécie dióica, falta de agentes polinizadores, dormência das sementes que inviabilizam a multiplicação por sementes e ainda dificuldade no enraizamento de estacas (STUMPF, 1997).

A polinização no hemisfério sul, ocorre de outubro a março e no hemisfério norte de junho a agosto. Na primavera, há produção de pólen e óvulos em espécies arbóreas separadas. A árvore

feminina deve estar crescendo na presença da árvore macho para ser fertilizada. Às vezes, as sementes e o pólen crescem em folhas carpelares, em sua maioria em árvores mais velhas (THE GINKGO PAGES, 2003). Após a polinização, as sementes parecem com pequenas ameixas quando maduras, com diâmetro aproximado de 1/2 polegada, contendo sementes prateadas, grandes e lisas ao centro (Figura 2) (GbEXTRACT, 2005).



**Figura 2.** Sementes de *Ginkgo biloba*. a) Ramo de uma árvore feminina de *Ginkgo biloba* com sementes formadas; b) vista geral das sementes de *Ginkgo biloba*; c) semente cortada longitudinalmente. Santa Maria-RS, 2003.

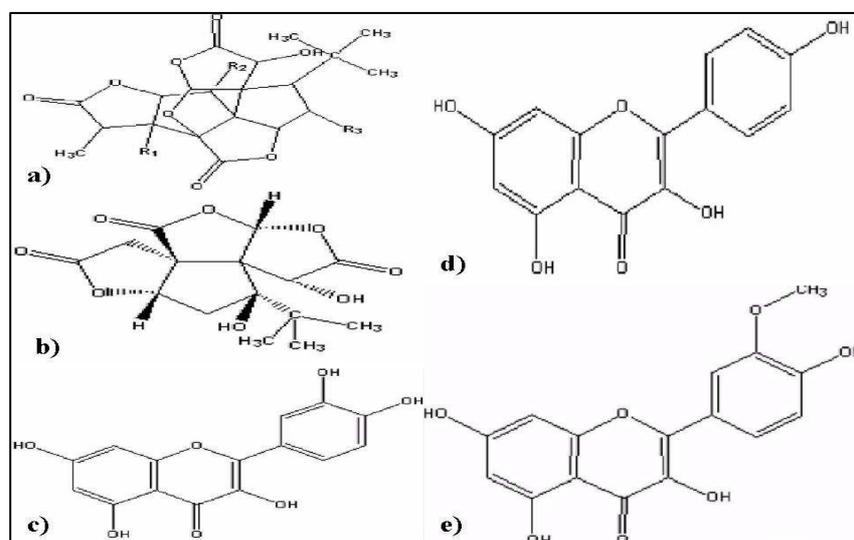
### 2.3 Uso terapêutico

Diversas propriedades farmacológicas são atribuídas a *Ginkgo biloba*, principalmente para o extrato de folha padronizado de

ginkgo, o EGb 761. Este é um dos extratos mais usados na Europa para aliviar sintomas associados a desordens cognitivas. O mecanismo de ação do EGb 761 no sistema nervoso central não é totalmente compreendido, mas os efeitos principais parecem estar relacionados as suas propriedades antioxidantes, as quais requerem a ação sinérgica de flavonóides, terpenos e ácidos orgânicos, os principais constituintes do extrato (LE BARS et al., 1997).

A composição química do extrato EGb 761, é definida por aproximadamente 6% de trilactonas terpênicas (2,8 a 3,4% dos ginkgolides A, B e C, respectivamente e 2,6 a 3,2% de bilobalide) e 24% de flavonóides (quercetina, kaempferol e isoharmnetina) (Figuras 3a-e), sendo que os ginkgolides A, B e C variações quanto sua posição na estrutura química das trilactonas terpênicas, conforme mostrado na Tabela 1 (GbEXTRACT, 2005).

Dentre as atividades destes compostos químicos, destacam-se sua ação em distúrbios vasculares cerebrais e periféricos, sua atividade comprovada como antagonista do fator de agregação plaquetária, atividade antioxidante e conhecida ação sobre a memória (GbEXTRACT, 2005).



**Figura 3.** Estrutura química dos constituintes do extrato de folha padronizado de *Ginkgo biloba* - EGb 761. a) ginkgolides A, B e C; b) bilobalides; c) quercetina; d) kaempferol; e) isoharmnetina. (Fonte: GbEXTRACT, 2005).

**Tabela 1.** Variações dos ginkgolides A, B e C quanto às posições na estrutura química das trilactonas terpênicas indicadas na figura 3a. (Fonte: GbEXTRACT, 2005)

EGb	R 1	R 2	R 3
<b>Ginkgolide A</b>	OH	H	H
<b>Ginkgolide B</b>	OH	OH	H
<b>Ginkgolide C</b>	OH	OH	OH

Existem também relatos do uso da ginkgo no tratamento de distúrbios oftálmicos, menopausa, em alguns tipos de câncer, sobre neurotransmissores, neuroproteção, depressão, desordens afetivas, infertilidade, queimaduras solares e vitiligo (JENSEN et al., 2002). A ginkgo ainda leva a produção de energia com o aumento da absorção de glicose na célula, forte ação neuroprotetora, aumento do fluxo sanguíneo no cérebro e maior transmissão nas fibras nervosas (VITABRASIL, 2005). Também é recomendado seu uso no tratamento de várias doenças, dentre elas insuficiência cerebrovascular, demência, Mal de Alzheimer, falha de memória, problemas circulatórios, renais, alergia, vertigem, perda auditiva, zumbido, doenças cardíacas, confusão mental, senilidade, perda visual, tendo também ação contra os radicais livres (LICHTBLAU et al., 2002).

Em relação ao uso cosmético, exerce ação anticelulítica, restauradora da vascularização do bulbo capilar e antioxidante, pois

atua no combate ao envelhecimento cutâneo, neutralizando a ação dos radicais livres na lipoperoxidação lipídica (BANOV, 1999).

## **2.4 Cultura de tecidos**

A cultura de tecidos é um processo através do qual pequenos fragmentos de tecido vivo, denominados de explantes, são cultivados em condições assépticas em meio de cultura, colocados em recipientes apropriados e mantidos em ambientes com luminosidade e temperatura controladas (CALDAS et al., 1998).

A possibilidade da manipulação de células, tecidos e órgãos *in vitro*, está fundamentada na capacidade das células vegetais, mesmo separadas da planta-mãe, de continuar a crescer quando cultivadas em condições apropriadas. De acordo com Doods e Roberts (1999), a cultura de tecidos baseia-se na expressão da totipotência celular, a qual diz respeito à capacidade de uma célula dar origem a um organismo completo. Esta teoria celular formulada por Haberlandt (1902 *apud* TORRES e CALDAS, 1990), tentou pela primeira vez, demonstrar a totipotencialidade das células das plantas, cultivando células e tecidos somáticos de várias espécies em solução nutritiva.

A cultura de tecidos vegetais traz significantes contribuições para a agricultura e indústria. Na agricultura, entre as principais aplicações estão relacionadas à produção de plantas haplóides, propagação de plantas em larga escala (micropropagação), obtenção de plantas livres de vírus (limpeza clonal), produção de metabólitos secundários, conservação de germoplasma *in vitro* para

manutenção de bancos genéticos e também na produção de plantas transgênicas. Porém, o maior sucesso em termos de aplicação prática e ao nível comercial obteve-se com a micropropagação, também chamada de propagação clonal *in vitro* (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

#### **2.4.1 Micropropagação**

A micropropagação é uma técnica muito utilizada na multiplicação de espécies olerícolas, ornamentais e medicinais, sendo esta rotineiramente utilizada para multiplicar genótipos selecionados, ou para substituir materiais que tenham adquirido caracteres indesejáveis como baixa produtividade e suscetibilidade à doenças.

Conforme Melo et al. (1999), a micropropagação de plantas, como técnica de propagação assexuada, apresenta diversas vantagens, como maior controle sobre a sanidade do material propagado, possibilitando ainda a rápida multiplicação de variedades que apresentam poucos indivíduos ou ainda reprodução de combinações híbridas desejáveis e a possibilidade das plantas serem multiplicadas em qualquer época do ano.

Muitas espécies medicinais apresentam limitações quanto a sua multiplicação em larga escala através de sementes e partes vegetativas. É para essas espécies que as técnicas de cultivo *in vitro* são indicadas (PEREIRA, 2003).

Realiza-se a micropropagação de plantas aromáticas e medicinais em geral, preferencialmente por meio do cultivo de ápices caulinares (região do domo meristemático acompanhado de

primórdios foliares) ou de segmentos nodais em meio de cultura pré-estabelecidos, como por exemplo em babosa (*Aloe vera*) (ARAÚJO et al., 2002), ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) (NICOLOSO et al., 2001), hipérico (*Hypericum perforatum* L.) (SANTARÉM et al., 2001) e calêndula (*Calendula officinalis* L.) (PEROTTI & SANTARÉM, 2002). Esses sistemas têm-se mostrado bastante confiáveis na produção de mudas sem alterações genéticas, que para tais não é necessária a desdiferenciação celular que aumenta a probabilidade de erros replicativos e, portanto, ao aparecimento de variantes somaclonais entre os produtos gerados (STEFAN et al., 1994 *apud* SERAFINI et al., 2001).

A atividade comercial de micropropagação concentra-se principalmente na limpeza clonal e na multiplicação de espécies ornamentais herbáceas, arbustivas, olerícolas e frutíferas. Num segundo plano, estão as espécies lenhosas, com destaque para a multiplicação de porta-enxertos de fruteiras de clima temperado e árvores de essências florestais de rápido crescimento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), os explantes mais indicados na propagação clonal *in vitro* são os ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados. O método de propagação a partir de ápices caulinares *in vitro* está baseado no crescimento dos primórdios meristemáticos induzidos pelo regulador de crescimento citocinina. Cada broto miniatura obtido, pode formar um conjunto de brotos que se subdividem em pequenos grupos e transferidos para meio fresco, e assim sucessivamente. As taxas de multiplicação apresentam grande variação de espécie para espécie,

mas é freqüentemente possível obter milhões de plantas no período de um ano, iniciando de um único ápice caulinar isolado (WILKIN & DOODS, 1999).

Cutter (1965 *apud* DOODS; ROBERTS, 1999), claramente diferenciou meristema apical do ápice caulinar, sendo que meristema apical se refere somente a região do domo meristemático, sem os primórdios foliares e ápice caulinar se refere ao meristema apical acompanhado por poucos primórdios foliares adjacentes. Segundo o mesmo autor, o meristema apical é pouco utilizado para a micropropagação como explante inicial, devido a dificuldade de excisão e a baixa taxa de sobrevivência do mesmo quando cultivado *in vitro*.

A maioria dos vírus infectam as plantas de forma sistêmica, por isso, torna-se necessário métodos especializados para promover a eliminação das infecções virais. Um dos métodos constitui-se na regeneração de plantas *in vitro*, a partir de pequenos brotos apicais em desenvolvimento, os quais devem ser menores que 0,5 cm (MANTELL et al., 1994). Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o ápice caulinar é livre de agentes causadores de doenças, por não ter um sistema vascular desenvolvido, constituindo-se em um material útil para a micropropagação. Da mesma forma, Pierik (1990), afirma que a falta de tecidos vasculares no meristema dificulta em grande parte o transporte de partículas viróticas, sendo esta uma possível explicação para a ausência ou muito baixa concentração de vírus nos meristemas.

A técnica da micropropagação compreende vários estágios, os quais primeiramente foram estabelecidos por Murashige

(1974), que subdividiu o processo de micropropagação em três etapas, sendo o enraizamento e aclimatização considerada uma única fase. Debergh (1991), posteriormente subdividiu em quatro estágios: estágio 0 (zero) envolve a seleção de plantas matrizes sadias; estágio I refere-se à fase de seleção de explantes, desinfestação e cultivo do mesmo em meio nutritivo sob condições assépticas; estágio II diz respeito a posterior multiplicação dos propágulos através de sucessivos subcultivos; estágio III compreende a transferência das partes aéreas para o meio de enraizamento e estágio IV ocorre o transplantio para o substrato e aclimatização.

Conforme Grattapaglia e Machado (1998), o estágio 0, corresponde ao tratamento dado à planta-mãe, de onde são retirados os explantes. Para o estágio I, os brotos excisados de plantas herbáceas saudáveis e em crescimento ativo são materiais ideais para a produção de múltiplos brotos. Quanto maior o explante utilizado, mais rápido é o crescimento e maior é a capacidade de sobrevivência do mesmo. Outros explantes podem ser utilizados para iniciar o cultivo *in vitro* para fins de micropropagação, entre eles: segmentos nodais, discos foliares, pecíolo, cotilédones, os quais apresentam diferentes graus de diferenciação, no entanto deve-se ter o cuidado do mesmo estar livre de patógenos.

#### **2.4.2 Processos Morfogenéticos *in vitro***

A morfogênese, conforme Handro e Floh (1990) é a consequência dos processos de divisão e diferenciação celular integrados, conduzindo a um nível de organização supracelular. Desta

forma células, tecidos e órgãos, sob a ação de fatores específicos de crescimento, podem ser induzidos a produzir respostas organizadas como gemas vegetativas, raízes e embriões somáticos. Esta expressão do processo morfogenético em células, tecidos e órgãos cultivados *in vitro* pode se dar a partir de diferentes rotas, como a calogênese, organogênese e a embriogênese somática (TRAN THAN VAN, 1980 *apud* MANTOVANI, 1997).

O controle da morfogênese, segundo Thorpe (1980 *apud* MANTOVANI, 1997) e Tran Than Van (1980 *apud* MANTOVANI, 1997), é exercido por fatores internos, inerentes ao explante, como o genótipo, condições fisiológicas e correlações entre células e tecidos e também por fatores externos como meio de cultura, reguladores de crescimento e condições ambientais.

De acordo com Handro e Floh (1990), uma das respostas mais comuns de um tecido cultivado *in vitro* é a formação de um calo, ou seja, de uma massa de células de proliferação contínua e mais ou menos desorganizada. Sua formação pode ser dividida basicamente em três estágios: indução, divisão e diferenciação, os quais caracterizam-se pela ocorrência de alterações no tamanho celular, estrutura e condições metabólicas do tecido (AITCHINSON et al., 1977). Qualquer tipo de órgão como raiz, talo, folha ou flor, pode ser utilizado como material inicial para a indução de calo (PIERIK, 1990).

A formação do calo é consideravelmente influenciada pela adição de reguladores de crescimento, genótipo, composição do meio nutritivo e fatores físicos de crescimento (luz, temperatura) (PIERIK, 1990). Porém, é importante ressaltar, que não somente a adição de requerimentos hormonais influencia este processo, mas também a

origem dos tecidos do explante (DOODS & ROBERTS, 1999). O crescimento do calo dentro de uma mesma espécie pode depender também da posição original do explante na planta (PIERIK, 1990), e na variação no nível de reguladores endógenos do explante, já que diferentes explantes obtidos a partir de um único genótipo não respondem identicamente ao cultivo, provavelmente devido às variações de gradiente dos hormônios endógenos (WERNICKE & BRETTELL, 1982).

Segundo Handro e Floh (1990), a organogênese caracteriza-se por apresentar um processo morfo-anatômica peculiar, no qual é observado a formação de um órgão definitivo. De acordo com Vieira e Glória (2002), a planta é regenerada a partir de meristemóides formados no tecido cultivado, os quais são unipolares e conectados vascularmente ao tecido de origem. Estes podem se originar de forma direta e indireta. Na direta, ocorre a formação de meristemas ou gemas diretamente sobre o explante, sem passagem pela fase de calo. Na indireta, o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo.

A obtenção de organogênese *in vitro* é atualmente considerado um processo empírico, pois para cada espécie ou mesmo para cada variedade dentro dela, são testadas diferentes fontes de explantes, composição mineral do meio de cultura, balanço hormonal e condições ambientais. Desse modo, quanto à fonte de explantes, normalmente haverá maior sucesso se forem utilizados tecidos jovens, os quais possuem maior competência organogenética (VIEIRA & GLÓRIA, 2002).

Em relação ao balanço hormonal, os principais reguladores de crescimento utilizados na organogênese são as auxinas e as citocininas, as quais geralmente são utilizadas concomitantemente. Outras classes de hormônios vegetais, como as giberelinas, o etileno e o ácido abscísico, também são muitas vezes utilizadas em processos de regeneração por organogênese. Existe considerável número de evidências de que o efeito dessas substâncias é indireto, através da alteração do balanço auxina/citocinina endógeno. O próprio efeito das auxinas e citocininas aplicadas ao meio de cultura parece ser, na verdade, o reflexo dessas substâncias alterando os balanços endógenos de auxina/citocininas nas células vegetais (PERES et al., 1999).

Finalmente, as condições ambientais influenciam diretamente a organogênese *in vitro*. Normalmente as salas de cultivo são mantidas em temperatura ambiente, a 25°C, sendo a luz o fator ambiental que parece mais afetar a organogênese. Muitos protocolos de regeneração são conduzidos no escuro, sobretudo para evitar a oxidação do explante na fase de estabelecimento. Apesar de serem seguidos princípios básicos, muitas vezes a organogênese *in vitro* não é obtida (PERES, 2003).

Na cultura de tecidos é importante entender alguns conceitos como desdiferenciação, aquisição de competência, indução, determinação, diferenciação e formação do órgão. Christianson e Warnick (1988) definem desdiferenciação como sendo o processo pelo qual as células perdem sua especialização e há uma reprogramação na expressão gênica, isso permite que uma célula ou tecido diferenciado dê origem a uma nova planta completa quando

manipulada *in vitro*. Aquisição de competência é a capacidade que a célula tem de assumir uma nova via de desenvolvimento em resposta aos estímulos exógenos. A indução diz respeito à iniciação de uma resposta particular de diferenciação a partir da desdiferenciação celular (reentrada no ciclo celular); e a determinação é o comprometimento com uma via específica de desenvolvimento como consequência de uma intensa diferenciação; diferenciação é quando as células num estado determinado executam um novo programa, produzindo um primórdio de gema ou raiz.

Quando um explante falha em desenvolver organogênese *in vitro*, essa falha se dá normalmente na etapa de aquisição de competência (KERBAUY, 1999). No processo de organogênese, a competência é entendida como a capacidade de responder ao estímulo hormonal necessário à indução da formação do órgão. A falha de competência de um tecido poderia refletir, na falta de receptores para a classe hormonal que irá induzir o processo organogênico (CARRY et al., 2001). Um outro fator associado à falta de competência organogênica seria o próprio metabolismo hormonal do explante, pois é ele que determina o balanço hormonal endógeno para indução de organogênese (PERES & KERBAUY, 1999).

Da mesma forma, Peres (2003) afirma que explantes comprometidos para vias particulares de desenvolvimento (elevada determinação para formar um órgão específico, como por exemplo, a formação de raízes), podem falhar na alteração dessa via para assumir outra. De modo geral, pode-se afirmar que, quanto maior for a determinação de um explante para uma via de desenvolvimento, menor será a competência para formar outro tipo de órgão. Tanto a

aquisição de competência quanto a determinação, são reflexos da expressão diferencial de genes envolvidos nos processos de desenvolvimento. Explantes poucos diferenciados como os ápices caulinares apresentam baixa determinação e alta competência a responder *in vitro*, isso justifica a preferência da utilização deste explante para iniciar o cultivo *in vitro*, principalmente para fins de micropropagação.

O autor relata ainda que, nesse processo de regeneração, há necessidade do estabelecimento de células competentes no explante inicial. Células meristemáticas que darão origem às gemas caulinares, podem se formar posteriormente ou podem estar pré-existentes no explante.

### **2.4.3 Meios de cultura**

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam em grande parte o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

Diversos meios básicos foram desenvolvidos para o cultivo *in vitro*. Estas formulações nutritivas foram desenvolvidas a partir de estudo de nutrição mineral de plantas que culminaram na definição da solução nutritiva de Knop. Gauttheret (1934), se baseou nesta solução nutritiva para formular os macronutrientes de seu meio nutritivo. Por outro lado, White (1998 *apud* CALDAS et al., 1998), após prolongados estudos com cultura de raízes de trigo e tomate, produziu uma composição diferente de macronutrientes, baseada na

solução nutritiva de Uspenski e Uspenskaria. Além dos macronutrientes, este meio continha micronutrientes, vitaminas e sacarose como suplementos orgânicos (CALDAS et al., 1998).

Desta forma, o meio White foi utilizado como meio básico para o cultivo de uma grande variedade de tecidos de diferentes espécies. Modificações posteriores, na composição do meio de cultura, foram realizadas para otimizar o crescimento dos calos *in vitro*, resultando num aumento das concentrações de sais em geral, diminuição na concentração de sódio e acréscimo de nitrogênio na forma de amônio para complementar o nitrato, dando origem ao meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962). O meio básico MS e o meio básico B<sub>5</sub> (GAMBORG et al., 1998 *apud* GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998), são usados na cultura de tecidos da grande maioria das espécies. Composições definidas de macro e de micronutrientes, vitaminas, água, carboidratos e ágar, constituem o meio básico (CALDAS et al., 1998).

Utilizam-se diversas formulações de meios básicos no início do cultivo. Não há uma formulação padrão, mas o meio MS, suas modificações e diluições, apresenta bons resultados para diversas espécies. No que se refere as lenhosas, entretanto, o meio MS não se mostrou satisfatório em alguns casos e composições mais diluídas em macronutrientes tiveram melhor desempenho. Desta forma, formulações foram especialmente desenvolvidas para espécies lenhosas (LLOYD & McCOWN, 1980; ANDERSON, 1984) e utilizadas frequentemente como alternativa ao meio MS (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

#### **2.4.3.1 Reguladores de crescimento**

Hormônios vegetais são substâncias orgânicas que ocorrem naturalmente e que têm função regulatória nas plantas. Conforme Caldas (1998), atualmente, são conhecidos vários grupos de hormônios vegetais, entre os quais a auxina, as citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico. Além destes grupos, outras substâncias como o ácido jasmônico e o ácido salicílico foram descobertas e demonstraram que controlam vários processos nas plantas.

Os grupos das auxinas, citocininas e giberelinas apresentam entre algumas das funções atuação na promoção do crescimento; enquanto o etileno e o ácido abscísico são considerados inibidores do crescimento. As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos.

Em 1957, Miller e Skoog (*apud* MANTOVANI, 1997) demonstraram que a formação *in vitro* de caules e raízes, era controlada pelas concentrações relativas entre auxina e citocinina. Meios de cultura contendo um balanço auxina/citocinina favorável a auxina, promoveram a formação de raízes em calo de tabaco (*Nicotiana tabacum*), e de modo inverso, balanços hormonais favoráveis a citocinina formaram gemas caulinares. Finalmente, balanços hormonais intermediários não levaram a uma diferenciação

das células e sim a uma maior proliferação delas e conseqüente crescimento do calo.

Entretanto, sabe-se que as substâncias sintéticas podem exercer efeitos de auxina ou citocinina. Entre as auxinas mais conhecidas estão o ácido naftalenoacético (ANA) e o 2,4-D (2,4 - diclorofenoxiacético). Ao contrário das substâncias naturais, chamadas de hormônios vegetais ou fitohormônios, os reguladores de crescimento sintéticos são classificados apenas como substâncias reguladoras de crescimento vegetal e muito utilizadas na elaboração dos meios de cultura para manipulação *in vitro*.

As diferenças em metabolismo e estabilidade das auxinas podem contribuir para as diferenças observadas na resposta *in vitro*. Por exemplo, o 2,4-D freqüentemente induz a formação de calo e pode ser importante em sistemas de embriogênese somática, enquanto o AIA (ácido indolacético) é ineficaz. Para tal, o AIA é considerado uma auxina fraca e instável, pois é facilmente degradável na presença de luz (KYTE & KLEYN, 1996). Ao contrário, o ANA é mais estável e geralmente utilizado em menores concentrações e em combinação com citocininas para indução de organogênese de parte aérea ou individualmente para produção de raízes. Já o AIB (ácido indolbutírico) é freqüentemente usado em meios de enraizamento *in vitro*.

Também existem diferenças entre as citocininas, sendo que o BAP (benzilaminopurina) induz a formação de grandes números de brotos e alta taxa de mutiplicação em muitos sistemas de micropropagação, já o uso de CIN (cinetina) pode ser mais eficaz dependendo da espécie ou variedade, mas esta citocinina geralmente

permite apenas o crescimento normal, sem brotações múltiplas (CALDAS et al., 1998).

Conforme Pierik (1990), as citocininas geralmente estimulam a divisão celular, principalmente se acompanhadas de uma auxina. Concentrações elevadas de citocinina (1 a 10 mg L<sup>-1</sup>), promovem a formação de brotos adventícios devido ao fato de diminuírem a dominância apical. Estas observações coincidem com as de Murashige (1977 *apud* MANTOVANI, 1997), que afirma que as citocininas induzem a divisão celular, quebra de dormência apical, indução e proliferação de gemas axilares e diferenciação de gemas adventícias.

Poucas culturas *in vitro* mostram respostas as giberelinas. Já são conhecidas mais de sessenta tipos deste regulador e só disponível comercialmente o GA<sub>3</sub> (ácido giberélico). Murashige (1965), citado por Caldas et al. (1998), observou um estímulo do crescimento de calo de fumo na presença de GA<sub>3</sub>. A presença de GA<sub>3</sub> também induziu o alongamento de plântulas de *Paspalum notatum*, obtidos a partir de calos embriogênicos, e quando usado em conjunto com o BAP promoveu um aumento significativo no número de brotações por grama de calo fresco (GRANDO et al., 2002).

O ABA (ácido abscísico) é um inibidor do crescimento *in vitro*. No entanto, esse hormônio tem sido muito utilizado para o desenvolvimento normal e para a maturação de embriões somáticos, evitando a sua germinação precoce. O etileno é um regulador de crescimento em forma gasosa, produzido por células vegetais, até mesmo por células *in vitro*. Esse composto pode não influir no padrão de desenvolvimento das culturas, mas a sua presença nas culturas é,

normalmente, regulada pelo tipo de fechamento ou vedação feito nos frascos de cultura do que pela composição do meio (CALDAS et al., 1998).

A composição e concentração de reguladores no meio constituem fatores determinantes no crescimento, na produção e no padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos. A combinação das diferentes classes e tipos de reguladores, deve ser utilizada de acordo com os objetivos do estudo no meio de cultura (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

#### **2.4.4 Micropropagação de espécies lenhosas**

Embora a micropropagação de muitas espécies de árvores vem sendo realizada a partir de cultura de ápices caulinares, espécies lenhosas apresentam algumas particularidades e problemas não usuais. Segundo Doods e Roberts (1999), os brotos devem ser obtidos de ramificações no estágio jovem de crescimento ou selecionados de brotações rejuvenescidas. Brotos obtidos de árvores maduras na fase adulta apresentam baixa capacidade de micropropagação, inclusive com dificuldade de enraizamento (PIERIK, 1990).

A micropropagação de espécies lenhosas permite a clonagem de exemplares adultos de difícil ou até impossível propagação através dos métodos convencionais. No entanto, para a maioria das espécies florestais de interesse econômico a aplicação dessa técnica, em larga escala, é limitada devido ao complicado enraizamento, além das deficiências anatômica e fisiológica das

plantas *in vitro*, o que obriga a passagem por um longo período de aclimatização (FRANCO et al., 1998).

De acordo com Wilkin e Doods (1999), a cultura de ápices caulinares de lenhosas requer vários tratamentos consecutivos. O broto excisado requer giberelina e citocinina exógenas para o crescimento. O explante posteriormente deve ser transferido para outro meio sem reguladores de crescimento para promover o alongamento do caule. Finalmente, a cultura deve ser cultivada num terceiro meio contendo auxina exógena para iniciação das raízes.

Tecidos contendo concentração relativamente alta de compostos fenólicos são difíceis de cultivar *in vitro*. Polifenolases estimuladas em tecido injuriado, oxidam estes compostos levando a formação de compostos de cor escura que inibem o crescimento. Os autores Hu e Wang (1983 *apud* WILKIN & DOODS, 1999), sugerem algumas técnicas para superar esta seqüência metabólica como adicionar antioxidante ao meio de cultura, mergulhar os explantes em soluções oxidantes antes do cultivo, subcultivar o tecido para meio fresco ao primeiro sinal de escurecimento e fornecer baixa intensidade de luz ou escuro durante o período inicial de cultura (WILKINS & DOODS, 1983).

Como afirma McCown (2000), a micropropagação tem sido utilizada numa crescente freqüência para árvores e arbustos ornamentais. A dificuldade relativa de micropropagar espécies perenes é enorme comparada às plantas herbáceas. A dificuldade de resposta *in vitro* pode ser denominada de "recalcitrância", resultante de um grande número de fatores. A complexidade do ciclo de vida vegetativo e o crescimento normalmente lento das espécies lenhosas, devido a

intensa dormência induzida por fatores sazonais e a marcante mudança nas características do crescimento conforme a planta passa da fase jovem para a fase adulta do seu ciclo de vida, complicam a responsividade e previsão de seu comportamento durante a propagação *in vitro*.

Árvores e arbustos apresentam sucesso na micropropagação somente na fase jovem de seu ciclo de vida; a mesma planta na fase adulta do seu ciclo de vida pode ter dificuldade ou mesmo impossibilidade no estabelecimento da micropropagação. Desta forma, brotações de tecidos novos devem ser usadas para iniciar a cultura ou um longo período de rejuvenescimento, ainda pela manipulação de plantas estoques ou por um seqüencial subcultivo *in vitro* dos brotos em crescimento, devem ser conduzidos antes de estabelecer uma micropropagação com sucesso (McCOWN, 2000).

Para espécies perenes, as taxas de crescimento dos brotos e outros tecidos, tais como calos cultivados *in vitro*, são usualmente mais lentas que observadas em plantas herbáceas. Esse crescimento lento pode complicar todos os estágios da micropropagação. Contaminações de tecidos isolados são muito difíceis de serem contidas, pois os organismos contaminantes podem facilmente crescer e tomar conta do tecido da planta apresentando crescimento lento. A produção de microbrotos pode requerer meses de crescimento em vez de semanas, fazendo com que a clonagem *in vitro* apresente menor retorno financeiro (McCOWN, 2000).

Segundo Bell e Reed (2002), entre todos os meios de cultura existentes para o cultivo *in vitro* de diversas espécies, ainda o mais utilizado é o MS. Entretanto, com espécies lenhosas esse meio de

cultura não se mostra satisfatório em alguns casos. Dessa forma, o meio básico Woody Plant Medium (WPM) (LLOYD & McCOWN, 1980), foi especialmente desenvolvido para essas espécies, as quais não toleram níveis relativamente altos de sais e cloreto encontrados em outras formulações de meio de cultura como o MS.

#### **2.4.4.1 Fase de estabilização**

Um aspecto proeminente do estabelecimento da cultura de brotos em espécies lenhosas perenes na micropropagação é a estabilização. Segundo McCown (2000), estabilização refere-se a um período quando brotos são ativamente mantidos na microcultura e durante o qual as características de crescimento dos brotos mudam para um tipo de crescimento mais aclimatado para o ambiente da microcultura. No início da estabilização (depois do isolamento inicial dos brotos e ápices caulinares), o crescimento inicial das gemas é caracterizado pelo crescimento irregular das brotações que freqüentemente produzem brotos com aparência anormal apresentando folhas distorcidas e grandes. A produção abundante de calos é também freqüentemente observada nesta fase inicial da estabilização.

O período requerido para que a estabilização esteja completa pode variar grandemente, pois depende da planta, de sua história e de outros fatores. De acordo com McCown (2000), algumas culturas podem ser estabilizadas depois de dois a cinco subcultivos. Outras culturas têm requerido mais que 20 subcultivos (mais de 2 anos). Algumas plantas como muitas espécies de carvalho (*Quercus*),

ainda não se estabilizaram com sucesso, não resultando na formação de brotos.

#### **2.4.4.2 Cultivo *in vitro* de *Ginkgo biloba***

No caso da *Ginkgo biloba*, poucos estudos foram realizados e relatados a nível de micropropagação com ápices caulinares ou segmentos nodais retirados de plantas adultas, visando estabelecer protocolos eficientes de multiplicação.

Martins et al. (2001), desenvolveram no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF, os primeiros trabalhos preliminares com ginkgo no Brasil. Foram testados dois tipos de explantes, ápices caulinares e segmentos nodais inoculados nos meios de cultura MS e WPM, suplementados com diversas combinações e concentrações dos reguladores de crescimento BAP e GA<sub>3</sub>. Ao final do experimento, constatou-se que os explantes de ápices caulinares apresentavam potencial morfogênético para a micropropagação, mas não regeneraram plantas, e os segmentos nodais retirados e inoculados de plantas matrizes sem tratamento prévio, apresentavam altas perdas por contaminação fúngica e bacteriana.

O cultivo de células *in vitro* de ginkgo foi primeiramente abordado por Tuleke (1967), porém somente em 1991 pela primeira vez foi relatado a produção de ginkgolides a partir de células cultivadas desta espécie (CARRIER et al., 1990).

Embriões somáticos de ginkgo foram produzidos a partir do cultivo de embriões zigóticos imaturos (LAURAIN et al., 1996),

embriões gametofíticos foram obtidos a partir de micrósporos isolados (LAURAIN et al., 1993a) e protoplastos obtidos de protálos femininos (LAURAIN et al., 1993b) resultando na seleção *in vitro* de plântulas produtoras de grandes quantidades de terpenos.

Balz et al. (1999), estudaram a produção de terpenos (ginkgolides e bilobalides) a partir do cultivo *in vitro* de células e raízes de ginkgo. Da mesma forma, Camper et al. (1997), obtiveram calos a partir de embriões maduros e cotilédones de ginkgo cultivados em meio MS, suplementado com 2,4-D e ANA. Diferentes tipos de ginkgolides foram detectados nos extratos dos tecidos de calos, demonstrando o potencial de produção e extração destes compostos *in vitro*.

Recentemente Yu et al. (2004), obtiveram a produção de metabólitos secundários em células mobilizadas de ginkgo cultivadas na presença de 2,4-D, KIN e ANA.

A formação de gemas adventícias em embriões zigóticos imaturos de ginkgo em meio de cultura MS suplementado com  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP e  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, foi observada por Choi et al. (2004).

Chu et al. (1987), relataram, pela primeira vez, a tentativa de desenvolver o processo de micropropagação de ginkgo, a partir de ápices caulinares inoculados em meio de cultura WPM sem reguladores de crescimento. Duas a três semanas depois, as plântulas obtidas foram transferidas para plugs para posterior enraizamento.

Hao et al. (2000), estudaram o efeito de vários fatores no crescimento e desenvolvimento de gemas axilares de ginkgo *in vitro* a partir do cultivo de segmentos caulinares em meio de cultura MS

suplementado com variadas concentrações dos reguladores de crescimento ANA e zeatina e diferentes doses dos aditivos nutricionais caseína hidrolisada e adenina, sendo os melhores resultados obtidos na presença de caseína hidrolisada em meio sem reguladores de crescimento.

Recentemente Tommasi e Scaramuzzi (2004), obtiveram produção de plantas completas de ginkgo a partir de ápices caulinares obtidos de plântulas germinadas *in vitro*, em meio de cultura MS acrescido de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento AIA, ANA, BAP e KIN suplementado com extrato de endosperma de ginkgo biloba, que após dois meses de cultivo *in vitro* propiciou a formação de calos organogênicos com múltiplas brotações e raízes.

Pesquisas desenvolvidas por Montes-López e Rodríguez-de la O (2001), sobre o cultivo *in vitro* de *Ginkgo biloba* a partir de ápices caulinares obtidos de plantas adultas, demonstraram o desenvolvimento de brotações utilizando altas concentrações de BAP (15 a 20 mg L<sup>-1</sup>), porém não regenerando plantas completas.

Dessa forma, trabalhos com outras espécies lenhosas como por exemplo a acerola (*Malpighia emarginata* DC.) (MELO et al., 1999), *Araucaria angustifolia* (GUERRA et al., 1993), aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) (DE ANDRADE et al., 2004), caixeta (*Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch.) (MANTOVANI, 1996), erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) (HÖRNER et al., 2001), espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) (FRANCO et al., 1998), eucalipto (*Eucalyptus grandis*) (CARVALHO et al., 1990), marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) (ERIG & SCHUCH, 2004), pereira (*Prunus mumme*) (MELLO-

FARIAS et al., 1996) e *Pinus elliotti* (GUERRA et al., 1993) serviram de referência para a realização deste estudo em ginkgo.

Outras técnicas biotecnológicas têm sido aplicadas em ginkgo visando à transferência de genes para melhorar a síntese de metabólitos secundários. Baltz et al. (1999), utilizando a *Agrobacterium rhizogenes* demonstraram transformação estável do gene *gus* em calos de ginkgo. Da mesma forma, Dupré et al. (2000), desenvolveram protocolo para transformação de ginkgo através do co-cultivo de embriões zigóticos com *Agrobacterium tumefaciens*, comprovando a introdução do gene *gus* e *npt II* pelos métodos moleculares de PCR e Southernblot. No entanto, nenhuma planta transgênica foi regenerada destes experimentos, demonstrando a dificuldade de resposta desta espécie *in vitro*.

#### **2.4.5 Microrganismos *in vitro***

Durante a micropropagação é bastante comum ocorrerem perdas significativas de material devido à contaminação por microrganismos presentes na superfície dos explantes ou endofíticos, principalmente fungos e bactérias. A ocorrência desse tipo de contaminação é mais freqüente quando se realiza a micropropagação de espécies lenhosas ou quando a assepsia é difícil de ser executada devido às características do explante ou por este estar localizado em regiões da planta-mãe próximas do solo (SUZIN, 2004).

As plantas dividem o ambiente em que vivem com uma ampla variedade de microrganismos, servindo muitas vezes de habitat para os mesmos. No decorrer do seu crescimento e desenvolvimento,

muitos dos organismos que habitam a superfície da planta entram nos tecidos através de aberturas naturais ou ferimentos, passando assim a colonizá-las. Dessa forma, há um desenvolvimento de uma flora de organismos endofíticos intercelulares (possuem dispositivos para penetrar na planta e seguem o caminho da patogenicidade ou latência) e intracelulares, os quais variam quanto a sua cultivabilidade, podendo ser intratáveis ou não cultiváveis e sua distribuição restringe-se ao floema ou xilema, de forma localizada ou sistêmica (KYTE & KLEYN, 1996).

Em síntese, se diz que todos os microrganismos presentes na superfície do tecido podem ser endófitos secundários facultativos em potencial. Uma vez tendo penetrado no tecido hospedeiro, os microrganismos podem escapar do efeito dos esterilizantes de superfície e conseqüentemente causar problemas no cultivo do tecido *in vitro* (CASSELS, 1991).

Os contaminantes internos das plantas geralmente se caracterizam por apresentar esporos capazes de tolerar condições adversas de calor, seca, frio, radiação ultravioleta e líquidos esterilizantes (PIERIK, 1990) e recebem a denominação de contaminantes endofíticos. De acordo com Serafini et al. (2001), consideram-se microrganismos endofíticos aqueles que vivem, pelo menos parte de seu ciclo, no interior de vegetais, aparentemente sem causar danos aos mesmos, sendo os fungos, como por exemplo dos gêneros *Alternaria* e *Fusarium* ou bactérias os principais representantes.

Em cultura de tecidos vegetais *in vitro*, a presença de microrganismos endofíticos geralmente significa sinônimo de perdas,

tanto em qualidade quanto econômicas (CASSELS, 1991). Devido à invasão da cultura, podem causar a morte do explante ou deixá-lo impróprio para o subcultivo. Este problema é mais notável quando o contaminante não se explicita durante os estádios iniciais e é expresso mais tarde na produção (PEREIRA, 2004). Prejuízos mais significativos podem ser atribuídos a desvios tardios no estágio II ou subsequentes, quando o volume de material em cultivo é maior. Essas perdas acontecem pela ausência de monitoramento da produção aliado à multiplicação clonal de estoques infectados. Quando as contaminações ocorrem em estágios mais tardios do processo de micropropagação, os prejuízos podem exceder os custos de produção (CASSELS, 1991).

Além de consideráveis perdas observadas em diferentes estágios do processo de micropropagação, a presença de contaminações microbianas ocultas nos materiais micropropagados coloca em risco a reputação de estado livre de patógeno dos mesmos, uma vez que, a bactéria fitopatogênica pode ser encontrada entre os organismos contaminantes dos mesmos (KAMOUN et al., 1997 *apud* SUZIN, 2004).

No caso específico de lenhosas, a obtenção de culturas assépticas é mais difícil, pois o processo de esterilização superficial (externa) geralmente não é eficiente na erradicação dos contaminantes (REED et al., 1997), principalmente quando se utilizam segmentos nodais ao invés de ápices caulinares. Alternativas para a solução deste problema indicam a cultura de ápices caulinares, o isolamento de explantes de plantas cultivadas em condições controladas e a utilização de antibióticos no meio nutritivo (PIERIK, 1990).

Segundo Galli et al. (1968), o meio de cultura de plantas pode fornecer um ambiente desfavorável para os microrganismos no início. Mas, no decorrer do tempo, ocorre a adaptação dos mesmos ao meio e o seu desenvolvimento é retomado, sendo assim a manifestação mais tardia de contaminantes *in vitro* pode estar relacionada à existência de um período de adaptação, em que o microrganismo retarda ou cessa o seu desenvolvimento enquanto as condições ambientais forem desfavoráveis (SUZIN, 2004).

A determinação da fonte de contaminação nos recipientes de cultura *in vitro* não é uma tarefa fácil, isto porque os contaminantes só são notados após alguns dias ou semanas de incubação em câmara de crescimento, por ocasião da movimentação dos recipientes de um local a outro do laboratório para fins de manipulação. Outro aspecto da contaminação *in vitro* é que a taxa de crescimento dos mesmos é muito mais rápida do que o tecido vegetal, tanto que conseguem povoar um recipiente, invadindo e destruindo a cultura (KYTE & KLEYN, 1996).

No estabelecimento da cultura de tecidos, dependendo do explante utilizado, os microrganismos da superfície e endofíticos podem permanecer e serem introduzidos no processo de cultivo. Até mesmo na cultura de meristemas, dependendo do tamanho do mesmo, muitos organismos são eliminados quando presentes em folhas, pecíolo ou haste, mas muitos ainda permanecem e serão carregados para a cultura *in vitro* (CASSELS, 1991).

## **2.5 Propagação por estaquia**

Estaquia é um método de propagação no qual um segmento da planta matriz é retirado, coletado em condições ambientais favoráveis e induzido à formar raízes e brotos com a finalidade de se obter uma nova planta (HARTMANN & KESTER, 1990). O termo estaca é utilizado para denominar esse segmento, que pode ser de ramos, raízes ou folhas, devendo ter pelo menos, uma gema vegetativa e capacidade de originar uma nova planta (FACHINELLO et al., 1995).

Para Corrêa et al. (1997), as estacas de plantas medicinais devem ser enterradas no substrato a uma profundidade de aproximadamente 2/3 do seu tamanho. Alguns enraizamentos podem ser demorados como no caso do alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Para diminuir a probabilidade de apodrecimento da estaca, algumas medidas podem ser tomadas, como a escolha de ramos maduros ou a imersão das estacas por 24 horas em solução de GA<sub>3</sub>.

As vantagens da estaquia são numerosas com margem para criar muitas plantas em espaço reduzido; uma planta pode originar muitas estacas; é um método rápido e simples, não requerendo as técnicas especiais de enxertia (HARTMANN & KESTER, 1990); além disso, é útil para a produção de porta-enxertos, quando esses forem necessários à adaptação da planta ao solo (NACHTIGAL & PEREIRA, 2000).

De acordo com Paiva e Gomes (1995), a estaquia é o método de maior viabilidade econômica para a produção de mudas. No entanto, segundo Fachinello et al. (1995), essa viabilidade está em função da facilidade de enraizamento de cada espécie ou cultivar, da qualidade do sistema radicular formado e do desenvolvimento

posterior da planta na área de produção. Mudanças obtidas por estaquia apresentam, no campo, o mesmo desenvolvimento e produção das plantas enxertadas.

Para Teixeira e Marbach (2000), a propagação de espécies florestais e ornamentais normalmente é feita via sementes, com exceção de algumas espécies como o eucalipto e o álamo, que podem ser multiplicados igualmente via estaquia de material juvenil.

### **2.5.1 Bases anatômicas e fisiológicas do enraizamento**

De acordo com Alvarenga e Carvalho (1983), a maioria das raízes adventícias de estacas de ramos originam-se de células que apresentam capacidade de tornarem-se meristemáticas. Estacas de plantas herbáceas, apresentam estas células entre os feixes vasculares e, estacas de plantas perenes, formam raízes a partir do floema ou de outros tecidos, como por exemplo, câmbio, raio vascular e medula.

Durante o preparo da estaca, o corte realizado provoca uma lesão dos tecidos, tanto no xilema quanto no floema, sendo que posteriormente ocorre uma cicatrização no local, dando origem a uma capa de suberina que reduz a desidratação da área cortada. Nesta região, há formação de uma massa de células parenquimatosas que constituem um tecido pouco diferenciado, desorganizado e em diferentes etapas de lignificação, denominado calo (FACHINELLO et al., 1995).

A formação de calo e de raízes são processos independentes na maioria das plantas, cuja ocorrência simultânea é devido a dependência de condições internas e ambientais. Porém, em

algumas plantas, a formação de calo pode ser precursora da formação de raízes adventícias (HARTMANN & KESTER, 1990).

O grau de esclerificação do floema primário exerce influência direta na capacidade de enraizamento de várias espécies, sendo que o aumento do teor de lignina nos tecidos pode criar barreiras mecânicas ou fisiológicas ao enraizamento (DAVIES JR. & HARTMANN, 1988).

Algumas substâncias endógenas produzidas em diferentes partes da planta, tais como auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno, podem prejudicar o processo de formação de raízes. Outras substâncias, como inibidores e estimuladores do crescimento, também podem afetar a formação de raízes, porém de maneira mais indireta (HARTMANN et al., 1997 *apud* NATCHIGAL, 1999).

As auxinas, como por exemplo o ácido indolbutírico (AIB), quando aplicadas em estacas de caule, acumulam-se na base e promovem a formação de meristemas e, em seguida, de raízes adventícias (ALVARENGA & CARVALHO, 1983).

Já as estacas retiradas de espécies com alta concentração de citocininas naturais apresentam dificuldades de formar raízes e, quando aplicadas de forma sintética, normalmente provocam inibição ao enraizamento (OKORO & GRACE, 1978 *apud* NATCHIGAL, 1999).

## **2.5.2 Principais fatores que afetam o enraizamento**

O processo de formação de raízes em estacas é afetado por um grande número de fatores que podem atuar isoladamente ou em conjunto. Assim, a capacidade de uma estaca emitir raízes depende dos fatores endógenos e das condições ambientais proporcionadas ao enraizamento. Necessita-se do conhecimento desses fatores, a fim de explicar porque determinada espécie apresenta facilidade ou dificuldade ao enraizar. Além disso, o adequado manejo permite que haja maior chance de sucesso na produção de mudas obtidas pela técnica de estaquia (FACHINELLO et al., 1995).

### **2.5.2.1 Fatores endógenos**

Os fatores endógenos mais importantes a se considerar no enraizamento são as condições fisiológicas e fitossanitárias da planta-mãe, o tipo de estaca, a época do ano ideal e o balanço hormonal.

Ao selecionar uma planta-mãe, devem ser escolhidas aquelas que estejam livres de moléstias, moderadamente vigorosas e de identidade conhecida (HARTMANN & KESTER, 1990).

Segundo Fachinello et al. (1995), o conteúdo equilibrado de alguns nutrientes, como fósforo, potássio, cálcio e magnésio também favorece o enraizamento, sendo que o excesso de manganês e de nitrogênio pode prejudicá-lo.

Em plantas de difícil enraizamento, podem ser utilizados tratamentos especiais, como a dobra de ramos e o anelamento, para melhorar a condição fisiológica ou nutricional da planta matriz e, com

isso, aumentar os índices de enraizamento das estacas (PAIVA & GOMES, 1995).

A idade da planta matriz também pode ser um fator determinante na formação de raízes, principalmente em espécies de difícil enraizamento. Estacas retiradas de plantas em estágio juvenil, período que vai do fim da germinação da semente até a primeira indução floral, enraízam com maior facilidade, pois apresentam multiplicação celular mais ativa (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

Nicoloso et al. (2001), obtiveram a propagação de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen), a partir da estaquia de 30 estacas de ramos por planta de dois anos de idade, em condições de viveiro sob ambiente controlado.

É recomendável a obtenção de brotações jovens em plantas adultas, pela poda drástica, as quais, mesmo não caracterizando uma verdadeira condição de juvenilidade, induz o enraizamento com maior facilidade (FACHINELLO et al., 1995). Scarpare Filho et al. (2002 *apud* OLIVEIRA, 2002) afirmam que, com o aumento da idade da planta, ocorre uma redução nas taxas de divisão celular e capacidade de regeneração, o que resulta em um pobre enraizamento e recomendam o uso de brotações jovens em plantas adultas para a estaquia.

Dessa forma, estacas de ramos são as mais importantes, e devem conter gemas terminais e/ou laterais, podendo ser classificadas de acordo com o grau de lignificação em herbáceas, semilenhosas ou lenhosas (HARTMANN & KESTER, 1990).

Como observa Fachinello (1995), estacas herbáceas são aquelas coletadas no período de crescimento vegetativo, quando os

tecidos apresentam alta atividade meristemática e baixo grau de lignificação. Ao final desse período, as estacas estão mais lignificadas que as primeiras e são consideradas semilenhosas. As estacas lenhosas apresentam maior taxa de regeneração potencial e alto grau de lignificação, sendo coletadas no período de dormência, após a queda das folhas. Segundo Hartmann e Kester (1990), o uso desse tipo de estaca é um dos meios mais baratos e fáceis de propagação vegetativa, sendo a melhor época para o enraizamento, os meses de maio e junho (FINARDI, 1998).

Toffanelli et al. (2002) observaram, através da realização de um experimento com estacas lenhosas de ameixeira coletadas no mês de junho, que o tipo de estaca e época de coleta são fatores críticos na determinação do percentual de enraizamento, pois a capacidade de formar raízes em estacas lenhosas é determinado pelo nível de esclerênquima e o aumento de substâncias inibidoras durante a dormência.

Estacas herbáceas geralmente enraízam com maior facilidade e rapidez que as demais. No entanto, exigem maior atenção e equipamentos adequados, como ambientes protegidos e nebulização intermitente, para evitar a desidratação (FINARDI, 1998).

Outra característica importante no enraizamento de estacas é a presença ou não de folhas e gemas, já que essas estruturas são importantes produtoras de auxinas e co-fatores de enraizamento (PAIVA & GOMES, 1995). Para Assis e Teixeira (1998), o número de folhas tem influência, principalmente, na velocidade de enraizamento e no número de raízes formadas, fato constatado por Alves et al. (1991), que obtiveram 45% de enraizamento em estacas

semilenhosas de acerola (*Malpighia glabra* L.), sem folhas, tratadas com AIB, em substrato arenoso. De acordo com Hartmann e Kester (1990), durante o período de intensa atividade vegetativa, as gemas exercem efeito estimulador no enraizamento. Por isso a capacidade de enraizamento é diferenciada em muitas espécies, em função da época do ano em que as estacas são coletadas (ASSIS & TEIXEIRA, 1998).

Quando estacas lenhosas são colocadas para enraizar no início da primavera, há uma tendência de que brotem com rapidez, devido aos dias quentes. As novas folhas em desenvolvimento começam a transpirar e retirar a água das estacas antes que estas possam formar raízes, por isso morrem rapidamente. No entanto, se as estacas são coletadas no outono, as gemas estarão em período de repouso, podendo formar raízes e se estabelecerem para a época de brotação das gemas, na primavera (HARTMANN & KESTER, 1990).

Conforme Fachinello et al. (1995), a capacidade de uma estaca formar raízes, varia de acordo com a espécie ou cultivar utilizada, ainda que a facilidade ou não de enraizamento seja o resultado de um conjunto de fatores e não somente do potencial genético.

Também para Assis e Teixeira (1998), a grande variação observada nas exigências e capacidade de enraizamento entre espécies e cultivares, tem dificultado o estabelecimento de protocolos gerais e funcionais de enraizamento. Por isso, é aconselhável agrupar os genótipos semelhantes, com base no padrão de resposta aos diferentes tratamentos.

De acordo com Floss (2004), o desenvolvimento das plantas é controlado, além dos fatores genéticos e ambientais, por

fatores fisiológicos ou hormonais. Durante o ciclo de desenvolvimento das culturas, esses compostos orgânicos influem nos processos fisiológicos, como a germinação de sementes, o crescimento, a floração, a frutificação e a senescência.

Para Raven et al. (1996), os fitohormônios são compostos orgânicos, não nutrientes ou vitaminas, que em quantidades extremamente pequenas, promovem, inibem ou modificam qualitativamente processos fisiológicos envolvidos com o desenvolvimento de parte ou da totalidade das plantas. Alguns hormônios vegetais são produzidos em um tecido, onde produzem respostas fisiológicas específicas; outros são produzidos num tecido e translocados para outros, nos quais estimulam determinada resposta fisiológica.

Segundo Floss (2004), de maneira geral, pode-se concluir que as auxinas, giberelinas e citocininas atuam na promoção do crescimento das plantas, enquanto o etileno e o ácido abscísico atuam como inibidores. Já para Teixeira e Marbach (2000), esta classificação não é inteiramente correta, pois uma determinada substância pode atuar como promotora ou inibidora, dependendo de sua concentração endógena e de outros fatores intrínsecos da planta.

Desta forma, também os metabólitos secundários, o ácido salicílico e o ácido jasmônico, vêm sendo estudados, cujos resultados preliminares indicam que estas substâncias possam igualmente ser consideradas hormônios vegetais. Essas moléculas desempenham uma função sinalizadora nos processos de resistência a patógenos e de defesa contra herbívoros (TAIZ & ZEIGER, 2004).

As auxinas são consideradas o grupo hormonal mais conhecido entre os reguladores de crescimento e podem ser encontradas na forma livre ou conjugada (HINOJOSA, 2000). O maior efeito está na formação de raízes em estacas, mas também exercem ação na ativação das células do câmbio, na promoção do crescimento das plantas, na inibição das gemas laterais, na abscisão de folhas e frutos (FACHINELLO et al., 1995 *apud* HINOJOSA, 2000).

A principal auxina de ocorrência natural nas plantas é o ácido indolacético (AIA), sintetizado nas gemas apicais e folhas novas (FACHINELLO et al., 1995). Substâncias sintéticas que mimetizam a ação de hormônios vegetais são denominados de reguladores de crescimento ou fitorreguladores (HINOJOSA, 2000).

Quando uma espécie não apresenta níveis de auxinas suficientes para a promoção do enraizamento, faz-se necessária a suplementação do teor hormonal através da aplicação exógena de um fitorregulador (HINOJOSA, 2000).

As raízes são extremamente sensíveis às auxinas e o mecanismo interno que controla o crescimento é pouco conhecido. Quando aplicada auxina a órgãos isolados, ocorre um aumento de resposta paralelo ao aumento da concentração até certo ponto máximo, após o qual ocorre um efeito inibitório (RAVEN et al., 1996).

Como explicita Floss (2004), as auxinas possuem um efeito pronunciado sobre a indução ao enraizamento de estacas, o qual se inicia pela formação de raízes adventícias, sendo uma prática muito utilizada na fruticultura e floricultura. Ocorre que a mesma concentração de auxinas que promove a indução ao enraizamento,

inibe o crescimento das raízes, portanto, os fitorreguladores não devem ser aplicados por período prolongado.

O objetivo de tratar as estacas com substâncias reguladoras do crescimento do tipo auxina é aumentar a porcentagem de estacas enraizadas, acelerar a iniciação das raízes, aumentar o número e a qualidade das raízes produzidas pelas estacas e também a uniformidade de enraizamento (FACHINELLO et al., 1995; HINOJOSA, 2000). De acordo com Hinojosa (2000), as raízes induzidas são funcionalmente idênticas às raízes da planta-mãe, porém nem todas as espécies respondem positivamente à auxina.

Os reguladores do enraizamento mais conhecidos são o AIA, AIB, ANA e o 2,4-D, sendo que o AIB é tido como o mais eficiente no enraizamento de estacas, porque apresenta maior estabilidade à luz solar que os demais reguladores e não é considerado tóxico para as plantas.

No que se relaciona especificamente a *Ginkgo biloba*, poucas pesquisas foram realizadas e relatadas quanto à propagação por estaquia visando estabelecer protocolos eficientes de produção de mudas.

Conforme Montes-Lopéz e Rodríguez-de la O (2001), a ginkgo é uma espécie muito difícil de propagar por métodos vegetativos, sendo que até o presente momento nenhum resultado relevante foi obtido usando métodos que promovam o enraizamento de estacas. Da mesma forma Stumpf (1997), cita que esta espécie possui dificuldades de enraizamento por estacas e dormência das sementes fora do seu habitat original, o conseqüentemente inviabiliza a multiplicação por sementes. Ao contrário, Hill (1985) relata que as

estacas enraízam muito bem, necessitando de cuidados especiais, como irrigação e fertilização adequadas.

Mello et al. (2003) realizaram um estudo sobre propagação de estacas lenhosas de ginkgo tratadas com 4 doses de AIB, no setor de estufas de propagação de plantas da FAMV/UPF, no qual observaram que as quatro diferentes concentrações de AIB utilizadas não aumentaram o enraizamento em substrato de casca de arroz carbonizada.

Já Chu et al. (1987) relatam a indução de enraizamento em miniestacas de ginkgo com 7 cm de comprimento, quando submetidas ao tratamento de solução de AIB. Após cinco semanas de realização do experimento, obtiveram aproximadamente 60 % de miniestacas enraizadas em bandejas de polietileno.

Shepperd (2003) também obteve o enraizamento de estacas de ginkgo de 10 a 15 cm de comprimento, utilizando a dose de 8000 mg L<sup>-1</sup> de AIB aplicado na forma de talco. Entre sete e oito semanas posteriores, observou-se que 46 % das estacas apresentavam-se enraizadas.

Assim sendo, devido as poucas pesquisas desenvolvidas sobre o cultivo de ginkgo, outros trabalhos com espécies florestais, frutíferas e medicinais como por exemplo alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (CORRÊA et al., 1997), araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) (NACHTIGAL et al., 1994), ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) (NICOLOSO et al., 2001), goiabeira (*Psidium guajava* L.) (DANTAS et al., 2003), mogno (*Swietenia macrophylla* King) (LOPES et al., 2001) e pessegueiro (*Prunus persica*) (OLIVEIRA, 2002) (TOFANELLI et al., 2002) (TREVISAN

et al., 2000) (DUTRA, 1999) serviram de referência para o presente estudo.

### **2.5.2.2 Fatores ambientais**

Os principais fatores ambientais relacionados ao enraizamento de estacas são a temperatura, luz, umidade e o tipo de substrato utilizado.

Para o enraizamento de estacas da maioria das espécies, são ideais temperaturas diurnas entre 21 e 27 °C (HARTMANN & KESTER, 1990), sendo que flutuações acentuadas são prejudiciais ao enraizamento e sobrevivência das mesmas (PAIVA & GOMES, 1995).

Temperaturas ambientais muito elevadas aumentam a taxa respiratória, provocando a desidratação da estaca. Além disso, tendem a estimular o desenvolvimento das brotações antes do desenvolvimento das raízes. A temperatura do substrato também influencia no enraizamento (KÄMPF, 2000), sendo recomendável manter-se a base das estacas em temperaturas mais elevadas que a das gemas (HARTMANN & KESTER, 1990; FACHINELLO et al., 1995). No entanto, essa temperatura deve ser controlada para não exceder o limite máximo tolerado pela estaca.

A influência da luz no enraizamento de estacas, quanto à intensidade, qualidade e fotoperíodo, está mais relacionada à planta-mãe, sendo importante fornecedora de energia para a fotossíntese (HARTMANN & KESTER, 1990).

Deve-se atentar que durante o período de enraizamento, a intensidade luminosa geralmente precisa ser reduzida a 50 % para evitar a insolação excessiva das estacas (PAIVA & GOMES, 1995).

A perda de água é uma das principais causas de morte de estacas, principalmente em espécies de difícil enraizamento. De acordo com Finardi (1998), é recomendado o uso de um sistema de nebulização. Conforme Grolli (2000), para que haja controle das condições ambientais, umidade relativa do ar e temperatura, o ideal é que o processo de estaquia seja desenvolvido dentro de uma câmara de nebulização. Para Kämpf (2000), evitando a desidratação da estaca e a queda das folhas, é mantida a fotossíntese, acelerando dessa forma, o processo de enraizamento.

Outro importante fator a ser considerado no auxílio do processo de enraizamento da estaca, é o tipo e a qualidade do substrato utilizado. O substrato apresenta basicamente a função de servir de sustentação às estacas, mantendo na sua base um ambiente úmido, escuro e suficientemente aerado (HARTMANN & KESTER, 1990). A qualidade de um substrato depende de suas propriedades físicas e químicas analisadas previamente em laboratório.

Os substratos podem ser de origem orgânica, inorgânica ou de material sintético. Alguns exemplos da diversidade de materiais utilizados são a vermiculita, turfa, serragem, areia, CAC e solo (FERMINO & BELLÉ, 2000). A casca de arroz é um subproduto proveniente do beneficiamento do arroz. Seu processo de carbonização consiste em submeter o produto a uma fonte de calor, sob o qual passa da cor amarela a preta. Apresenta pH neutro, baixa

salinidade, boa porosidade, elevado espaço de aeração, baixa retenção de água e estabilidade estrutural (FERMINO & BELLÉ, 2000).

O substrato influi significativamente no enraizamento de estacas, afetando a porcentagem de estacas enraizadas e a qualidade do sistema radicular formado (HARTMANN & KESTER, 1990; PAIVA & GOMES, 1995).

## CAPÍTULO I

### CULTIVO *IN VITRO* DE ÁPICES CAULINARES E SEGMENTOS NODAIS DE *Ginkgo biloba* L. EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

**Paloma Alves da Silva Sexto<sup>1</sup>; Magali Ferrari Grandó<sup>2</sup>; Alexandre Augusto Nienow<sup>3</sup>; Delvino Nolla<sup>4</sup>**

**RESUMO** – *Ginkgo biloba* é considerada uma importante árvore ornamental no continente asiático e produz um grande número de princípios ativos em suas folhas, entre eles trilactonas terpênicas (ginkgolides e bilobalide) e flavonóides. A condição de planta dióica e o reduzido número de exemplares disponíveis justifica o desenvolvimento de técnicas alternativas para sua reprodução. O presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento dos ápices caulinares e segmentos nodais durante o cultivo *in vitro*, para micropropagação dessa espécie. Dois experimentos foram realizados, onde explantes, provenientes de duas plantas matrizes, foram inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com diferentes

---

<sup>1</sup> Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>., Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

<sup>2</sup> Orientadora, Bióloga, Ph.D., professora de Genética, Biotecnologia e Biologia Molecular da FAMV-ICB/UPF.

<sup>3</sup> Co-orientador, Eng. Agr., Dr., professor de Fruticultura e Silvicultura da FAMV/UPF.

<sup>4</sup> Eng. Agr., M.Sc., professor de Plantas Medicinais da FAMV/UPF.

concentrações dos reguladores de crescimento benzilaminopurina (BAP 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>) ácido naftalenoacético (ANA 0 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) e ácido giberélico (GA<sub>3</sub> 0 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>). Utilizou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso com dez (experimento 1) e seis (experimento 2) repetições por tratamento, sendo a unidade experimental constituída de um tubo de ensaio contendo um explante. Aos 30 e 60 dias de cultivo, avaliou-se o desenvolvimento de brotações, formação e tipo de calo, frequência e diâmetro de calos organogênicos. As médias foram submetidas à análise de variância e a frequência de calos foi avaliada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 5 % de significância. Não foi possível estabelecer o cultivo *in vitro* a partir de segmentos nodais em ambos os experimentos, devido à perda de 100 % dos mesmos por contaminação fúngica. No experimento 1, os ápices caulinares, obtidos de árvore jovem produziram brotações através do desenvolvimento de meristemas pré-existentes quando cultivados em meio de cultura sem reguladores de crescimento. A presença de BAP no meio de cultura propiciou a formação de calos em 100 % dos ápices caulinares. Foi evidenciado a importância da combinação BAP+ANA na produção de calos organogênicos em *Ginkgo biloba* aos 30 dias de cultivo. A adição de GA<sub>3</sub> não teve efeito positivo na indução de calos organogênicos. Aos 60 dias de cultivo, houve redução na frequência de calo organogênico em todos os tratamentos. Os calos desenvolvidos em meio suplementado com 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP mantiveram-se verdes e saudáveis por mais tempo. A combinação de reguladores de crescimento no meio influenciou o diâmetro inicial dos calos observados aos 30 dias de cultivo. Explantes obtidos de árvore

adulta (experimento 2), apresentam alto índice de contaminações *in vitro*. Somente calos produzidos em meio com a combinação 2 BAP e 2 BAP+0,1ANA sobreviveram até os 60 dias de cultivo. Não foi possível regenerar plantas a partir dos calos obtidos nestes dois experimentos, devido à necrose dos mesmos ao longo dos subcultivos.

**Palavras-chave:** Cultura de tecidos, Calogênese, Organogênese.

**IN VITRO CULTURE OF *Ginkgo biloba* L. SHOOT-TIPS AND  
NODAL SEGMENTS ON DIFFERENT CULTURE MEDIA**

**Paloma Alves da Silva Sexto<sup>1</sup>; Magali Ferrari Grando<sup>2</sup>; Alexandre  
Augusto Nienow<sup>3</sup>; Delvino Nolla<sup>4</sup>**

**ABSTRACT** - *Ginkgo biloba* is considered an important ornamental tree in the Asian continent and produces a great number of active principles in its leaves, among them are the ginkgolides, bilobalide and flavonols. The condition of dioecious plants and the reduced number of available samples, justify the development of alternatives techniques for its reproduction. The present study had the aim to evaluate the behavior of shoot-tips and nodal segments during the *in vitro* culture, with the aim of developing a future micropropagation protocol for this specie. Two experiments were carried out with shoot-tips and nodal segments, from two selected plants, inoculated in culture media WPM (LLOYD and McCOWN, 1980), supplemented with different concentrations and combinations of growth regulators benzilaminopurine (BAP 0.5, 1.0 and 2.0 mg L<sup>-1</sup>), naftalenoacetic acid

---

<sup>1</sup> Agronomist, Master student in Agronomy Graduation Program, Major in Plant Production at Department of Agronomy and Veterinarian Medicine – University of Passo Fundo (FAMV/UPF).

<sup>2</sup> Adviser, Biologist, Ph.D., professor of Genetics, Biotechnology and Molecular Biology, FAMV-ICB/UPF.

<sup>3</sup> Co-adviser, Agronomist, Dr., professor of Fruit and Silviculture, FAMV/UPF.

<sup>4</sup> Agronomist, M.Sc., professor of Herbal plants, FAMV/UPF.

(ANA 0 and 0.1 mg L<sup>-1</sup>) and giberelic acid (GA<sub>3</sub> 0 and 0.5 mg L<sup>-1</sup>). It was used the randomized blocks experimental delineation with ten (experiment 1) and six (experiment 2) replications per treatment, and the experimental unit consisted in the test tube having one explant. At 30 and 60 days of cultivation, it was evaluated the development of the explants *in vitro*, callus and type of callus, frequency and diameter of organogenic callus. The average were submitted to the ANOVA (Statistic Analysis System) and the frequency of callus evaluated by the non-parametric test of Kruskal-Wallis et 5 % of significance. It was not possible to establish the cultivation *in vitro* from the nodal segments due to the loss of 100 % of them, because of the fungi contamination. In the first experiment, the shoot-tips obtained from young tree produced shoots through the development of pre-existing meristems when cultivated in the culture medium without growth regulators. The presence of BAP in the medium induced the formation of callus in 100 % of shoot-tips. It was evidenced the importance of the combination of BAP+ANA in the production of organogenic callus in *Ginkgo biloba* at 30 days of culture. At 60 days of culture there was reduction in the frequency of this type of callus in all treatments. The callus developed on medium supplemented with 2 mg L<sup>-1</sup> of BAP were maintained green and healthy for a longer period of time. The growth regulators combination influenced the initial callus diameter at 30 days of cultivation. Explants obtained from a mature tree (experiment 2), presented high levels of *in vitro* fungi contamination. Only calli produced in the presence of 2BAP e 2BAP+0,1ANA survived until the 120 days of culture. It was not

possible to regenerate plants from callus obtained in these two experiments, due to the necrosis along the subculture.

**Key-Words:** Tissue culture, Callus. Organogenesis.

## 1 INTRODUÇÃO

A ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) é uma gimnosperma de origem asiática, sendo a única espécie viva pertencente à família Ginkgoaceae (TESKE, 1995). Esta espécie já foi ameaçada de extinção, mas atualmente faz parte da arborização urbana de várias cidades asiáticas (HOBBS, 1991).

A ginkgo, por apresentar propriedades medicinais, tem sido usada em larga escala em âmbito mundial, tanto pela medicina popular como pela indústria fitoterápica (CHANG & CHANG, 1997).

Atualmente cientistas da área da medicina têm comprovado o efeito benéfico dos compostos químicos desta espécie (flavonóides e ginkgolides), para o tratamento de diversas doenças (MONTEZ-LÓPEZ & RODRÍGUEZ-de la O, 2001). Estes compostos regulam a circulação sanguínea e cerebral (Mannfried, 1985 apud MONTEZ-LÓPEZ & RODRÍGUEZ-de la O, 2001), e são úteis nas enfermidades do coração e dos olhos, bem como na prevenção e no tratamento de vários estados de demência (Foster, 1990 apud MONTEZ-LÓPEZ & RODRÍGUEZ-de la O, 2001).

A ginkgo apresenta dificuldades de propagação através de métodos vegetativos, principalmente fora do seu local de origem. Em adição a isso, a espécie é dióica, requerendo a presença de plantas masculinas e femininas para a formação de sementes, e como toda gimnosperma, seu estágio juvenil é longo. Desta forma, a cultura de tecidos *in vitro*, surge como uma alternativa de propagação, principalmente para espécies que apresentam propriedades de

interesse medicinal e ornamental como a ginkgo (MONTEZ-LÓPEZ & RODRÍGUEZ-de la O, 2001).

A micropropagação é uma técnica muito utilizada para a multiplicação de inúmeras espécies, entre as quais as medicinais, para multiplicar genótipos selecionados, mantendo características desejáveis como produtividade, resistência a pragas e doenças, ou para superar problemas com a inviabilidade das sementes limitantes à multiplicação em larga escala (PEREIRA, 2003).

A micropropagação pode se dar através de dois processos morfogênicos pelos quais é possível regenerar plantas *in vitro* a partir de explantes: organogênese e embriogênese somática, por vias diretas ou indiretas. A organogênese é o processo pelo qual, tecidos vegetais dão origem a órgãos vegetativos pelo desenvolvimento de gemas pré-existentes ou pela indução de gemas adventícias. Este processo pode ocorrer de forma direta (sem formação de calo) ou indireta, através da formação de calo (Thorpe, 1994 *apud* MANTOVANI, 1997). Da mesma forma, na embriogênese somática direta, os embriões somáticos se formam na superfície do explante sem passar pela fase do calo, enquanto que na indireta os embriões somáticos se formam na superfície do calo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Vários fatores influenciam as respostas das células, tecidos e órgãos *in vitro*, entre eles o genótipo, tipo de explante e tipo e concentração de reguladores de crescimento, constituição do meio de cultura, bem como as condições ambientais durante o cultivo (Narayanaswamy, 1977 *apud* MANTOVANI, 1997).

A micropropagação de plantas aromáticas e medicinais é feita preferencialmente por meio da cultura de ápices caulinares ou de segmentos nodais. Esses sistemas têm se mostrado bastante confiáveis na produção de plantas com menores riscos de alterações genéticas, por utilizarem rotas diretas, sem a passagem pela fase de calo (STEFAN et al., 1994).

A composição salina mais utilizada nos meios de cultura é a MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), geralmente suplementada com reguladores de crescimento que permitem direcionar as respostas morfogênicas (George, 1996 *apud* ABREU & PEDROTTI, 2003). Entretanto, com espécies lenhosas o meio MS não se mostrou satisfatório em alguns casos, observando-se que composições mais diluídas em macronutrientes tiveram melhor desempenho, como é o caso do marmeleiro (ERIG & SCHUCH, 2004). Formulações especialmente desenvolvidas para estas espécies, com o meio WPM (Wood Plant Medium – LLOYD & McCOWN, 1980), servem como alternativa ao meio MS.

As citocininas e auxinas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos (CALDAS et al., 1990). Dentre as citocininas utilizadas na formulação dos meios de cultura, o benzilaminopurina (BAP) geralmente é utilizado em combinação com auxinas como o ácido naftalenoacético (ANA), e de giberelinas como o ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).

Existem poucos relatos quanto à utilização da técnica de micropropagação em ginkgo. Os trabalhos têm mostrado a produção de calos a partir de embriões e tecidos cotiledonares (CAMPER et al., 1997), cultura de células e raízes para extração de ginkgolides *in vitro*

(BALZ et al., 1999), cultivo de ápices caulinares com desenvolvimento de folhas expandidas, mas sem a obtenção de plantas completas (MONTEZ-LÓPEZ & RODRÍGUEZ-de la O, 2001) e regeneração de plantas a partir de ápices caulinares obtidos de plântulas germinadas *in vitro* (TOMMASI & SCARAMUZZI, 2004).

Visando estabelecer um protocolo básico para a micropropagação de ginkgo, este trabalho avalia as respostas *in vitro* de dois tipos de explantes (ápices caulinares e segmentos nodais), provenientes de duas matrizes de *Ginkgo biloba*, em meio de cultura básico WPM suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento.

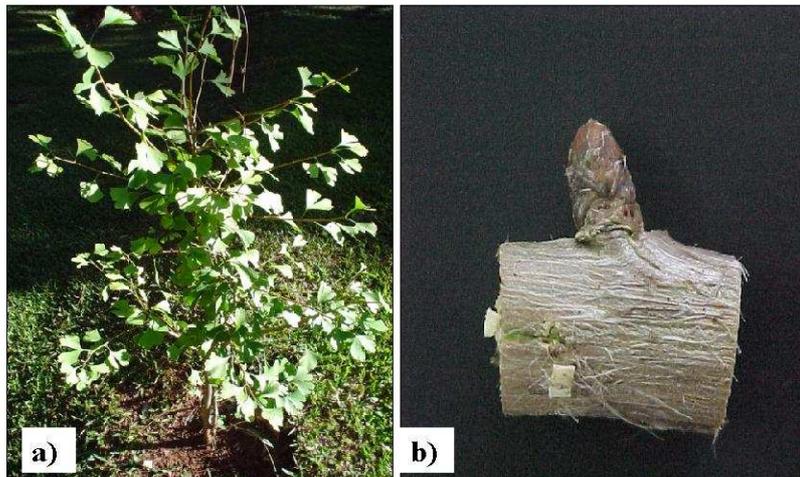
## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi conduzido em dois experimentos, no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo-RS. No primeiro experimento foram cultivados, em sete meios de cultura, ápices caulinares e segmentos nodais obtidos da planta matriz jovem da FAMV/UPF, no período de outubro de 2003 a maio de 2004. No segundo, explantes de ápices caulinares e segmentos nodais coletados da planta matriz adulta, foram cultivados em dez meios de cultura, no período de dezembro de 2003 a abril de 2004.

## 2.1 Experimento I

### 2.1.1 Cultivo de ápices caulinares e segmentos nodais de matriz jovem de *Ginkgo biloba* em diferentes meios de cultura

Ápices caulinares e segmentos nodais foram obtidos de estacas herbáceas, com comprimento entre 12 e 17 cm, provenientes de uma planta jovem de ginkgo, com cinco anos de idade, localizada no Campus I da UPF (Figura 1a). As estacas foram seccionadas em segmentos de 1,5 cm de comprimento, contendo uma gema axilar (Figura 1b).



**Figura 1.** Material vegetal de *Ginkgo biloba*. a) Planta matriz cultivada na FAMV/UPF; b) segmento nodal de 1,5 cm de comprimento contendo uma gema axilar. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003.

As estacas passaram por uma pré-desinfestação com água corrente no laboratório. Em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, as mesmas foram lavadas com álcool 70 %, por 5 minutos, e imersas em uma solução de 1,5 % de hipoclorito de sódio (50 % do produto comercial Mazarolo), contendo 3 gotas de tween 20 por 100 mL de água, e agitadas por 20 minutos. Após, foram enxaguadas três vezes com água destilada/deionizada e autoclavada para limpeza dos resíduos dos produtos utilizados. A seguir, os ápices caulinares, com aproximadamente 0,3 cm de comprimento foram obtidos com o auxílio de uma lupa estereoscópica de 35x de aumento, pinças e bisturis previamente esterilizados.

Os segmentos nodais e ápices caulinares foram cultivados em meio básico WPM (Wood Plant Medium – LLOYD & McCOWN, 1980), com sete variações na concentração de reguladores de crescimento BAP, ANA e GA<sub>3</sub> (Tabela 1). Estes meios de cultura foram suplementados com as vitaminas tiamina 1,0 mg L<sup>-1</sup>, ácido nicotínico 0,5 mg L<sup>-1</sup> e piridoxina 0,5 mg L<sup>-1</sup>, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (marca comercial Merck) e o pH 5,8 ajustado com HCl a 0,1 N.

**Tabela 1.** Combinações de reguladores de crescimento em meio básico WPM para cultivo de ápices caulinares e segmentos nodais de *Ginkgo biloba*. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003

Tratamentos	BAP (mgL <sup>-1</sup> )	ANA (mgL <sup>-1</sup> )	GA <sub>3</sub> (mgL <sup>-1</sup> )
(1) WPM 0	0,0	0,0	0,0
(2) 1BAP	1,0	0,0	0,0
(3) 1BAP +0,1ANA	1,0	0,1	0,0
(4) 1BAP+0,1ANA+0,5GA <sub>3</sub>	1,0	0,1	0,5
(5) 2BAP	2,0	0,0	0,0
(6) 2BAP+0,1ANA	2,0	0,1	0,0
(7) 2BAP+0,1ANA+0,5GA <sub>3</sub>	2,0	0,1	0,5

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com 10 repetições, sendo cada repetição constituída de um tubo de ensaio contendo um ápice caulinar e/ou um segmento nodal.

Tanto os ápices caulinares como os segmentos nodais, foram inoculados em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo o meio de cultura estéril (15 mL), vedados com papel alumínio e filme transparente de PVC, e cultivados em câmara de crescimento no escuro a  $25 \pm 2$  °C.

Passados cinco dias de cultivo, as culturas foram transferidas para a sala de crescimento com ambiente de luz e temperatura controlados (fotoperíodo de 16 horas luz/dia a  $25$  °C  $\pm$  2 °C e luminância de  $\pm 25$  mmol.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>). Após 30 dias de cultivo, os explantes e estruturas formadas foram subcultivadas em meio fresco com composição idêntica ao meio de isolamento.

Para avaliação da resposta *in vitro*, foram analisadas as seguintes características: desenvolvimento do explante, formação e tipo de calo e diâmetro transversal dos calos organogênicos. Duas

medidas de diâmetro foram tomadas: a primeira, do calo retirado diretamente do tubo de ensaio (diâmetro inicial) e a segunda após limpeza e retirada das regiões necrosadas (diâmetro final).

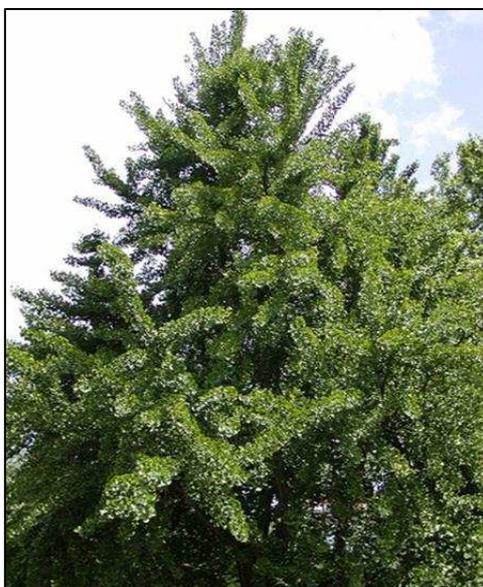
Foram realizados subcultivos a cada 30 dias, acompanhado de novas avaliações.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo pacote estatístico SAS (Statistic Analysis System) (SAS Institute, 1998). Comparou-se o tipo de calo pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, a 5% de significância.

## **2.2 Experimento II**

### **2.2.1 Cultivo de ápices caulinares e segmentos nodais de matriz adulta de *Ginkgo biloba* em diferentes meios de cultura**

Para este experimento foi utilizado como explantes estacas herbáceas e semilenhosas coletadas de uma planta matriz adulta feminina de aproximadamente 60 anos de idade, 15 m de altura (Figura 2), localizada na área residencial no distrito de Camobi, município de Santa Maria, RS.



**Figura 2.** Árvore adulta feminina de *Ginkgo biloba* utilizada como matriz. Santa Maria-RS, 2003.

Os ápices caulinares e segmentos nodais foram coletados e desinfestados como descrito no experimento anterior. Posteriormente, com o objetivo de controlar as contaminações fúngicas, os explantes foram enxaguados com os fungicidas carbendazin e hiprodiona (filtrados, na concentração de 30 ppm ).

Os explantes foram cultivados em meio básico WPM com dez variações na concentração de reguladores de crescimento BAP, ANA e GA<sub>3</sub> (Tabela 2). Estes meios de cultura foram suplementados com as vitaminas tiamina 1,0 mg L<sup>-1</sup>, ácido nicotínico 0,5 mg L<sup>-1</sup> e piridoxina 0,5 mg L<sup>-1</sup>, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (marca comercial Merck), tendo o pH ajustado para 5,8 com HCl a 0,1 N.

As condições de cultivo e as avaliações realizadas se igualam as descritas no experimento 1, sendo que para este experimento foram realizadas seis repetições por tratamento.

**Tabela 2.** Combinações de reguladores de crescimento em meio básico WPM para cultivo de ápices caulinares e segmentos nodais de *Ginkgo biloba*. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003

Tratamentos	BAP (mgL <sup>-1</sup> )	ANA (mgL <sup>-1</sup> )	GA <sub>3</sub> (mgL <sup>-1</sup> )
(1) WPM 0	0,0	0,0	0,0
(2) 1BAP	1,0	0,0	0,0
(3) 1BAP +0,1ANA	1,0	0,1	0,0
(4) 1BAP+0,1ANA+0,5GA <sub>3</sub>	1,0	0,1	0,5
(5) 2BAP	2,0	0,0	0,0
(6) 2BAP+0,1ANA	2,0	0,1	0,0
(7) 2BAP+0,1ANA+0,5GA <sub>3</sub>	2,0	0,1	0,5
(8) 0,5BAP	0,5	0,0	0,0
(9) 0,5BAP + 0,1ANA	0,5	0,1	0,0
(10) 0,5BAP + 0,1ANA+0,5GA <sub>3</sub>	0,5	0,1	0,5

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Experimento I

Após 30 dias de cultivo, os ápices caulinares cultivados em meio WPM 0 (tratamento 1) apresentaram brotações e expansão foliar, a partir do desenvolvimento de meristemas pré-existent (Figura 3).



**Figura 3.** Formação de brotos e folhas em ápices caulinares de *Ginkgo biloba* cultivados em meio WPM, sem reguladores de crescimento, aos 30 dias de cultivo. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003.

As folhas se expandiram a partir de meristemas pré-existentes, não sendo observado a formação de calos. No entanto, estas brotações permaneceram pequenas, não alongando com o tempo de cultivo. Este padrão de desenvolvimento observado *in vitro* é semelhante ao que ocorre *in vivo*, visto que a maioria dos ápices da planta dão origem a folhas em fascículos, em ramos curtos que não apresentam alongamento (Figura 1d da revisão de literatura).

Neste experimento, o ápice caulinar cultivado não produziu brotações múltiplas e gemas adventícias.

Aos 60 dias de cultivo, 89 % dos ápices cultivados em meio sem regulador de crescimento (WPM 0) apresentaram necrose, demonstrando o baixo grau de sobrevivência.

A dificuldade de regenerar planta completa de *Ginkgo biloba*, a partir do cultivo de ápices caulinares de árvores também foi constatada por Tommasi e Scaramuzzi (2004), que somente obtiveram regeneração de plantas completas quando cultivaram gemas apicais e

nodais de plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro*, com a presença de extrato de endosperma. Por se tratar de tecidos jovens, os mesmos são mais responsivos *in vitro*, quando comparados aos tecidos de um explante obtido de árvore. O efeito da idade do explante na resposta *in vitro* é amplamente discutido na literatura (LAURAIN et al., 1996; CHOI et al., 2003; GRANDO et al., 2002; PIERIK, 1990).

Chu et al. (1987) relataram pela primeira vez a tentativa de desenvolver o processo de micropropagação de ginkgo, a partir de ápices caulinares inoculados em meio de cultura WPM sem reguladores de crescimento. Entre duas e três semanas de cultivo observaram a formação de brotações, que foram transferidas para enraizamento em substrato e aplicação da dose de 3000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, na forma de talco. O desenvolvimento direto de brotações em ginkgo também foi observado por Hao et al. (2000), através do cultivo *in vitro* de gemas apicais em meio de cultura MS, sem reguladores de crescimento mas com suplementos nutricionais.

Ao longo do segundo e terceiro subcultivos, os ápices e brotações sobreviventes (11 %) apresentaram contaminações bacterianas. Mediante identificação no Laboratório de Bacteriologia e Microbiologia da UPF, as mesmas foram classificadas como sendo endofíticas, aeróbias e gram positivas.

De acordo com Serafini et al. (2001), microrganismos endofíticos são aqueles que vivem, pelo menos parte de seu ciclo, no interior de vegetais aparentemente sem causar danos aos mesmos. No entanto, em cultura de tecidos, a presença de microrganismos endofíticos geralmente é sinônimo de perdas, tanto em qualidade quanto em quantidade (CASSELS et al., 1991).

Segundo Pereira et al. (2003), as contaminações causadas por bactérias endofíticas não apresentam crescimento visível no meio de cultura e nem sintomas nos tecidos, sendo detectadas somente após algum tempo de cultivo.

Em contraste com a resposta obtida na ausência de reguladores de crescimento, todos os meios contendo BAP combinado ou não com auxina, induziram a calogênese em 100% dos ápices caulinares cultivados aos 30 dias de cultivo. Hao et al. (2000) também observaram a indução e formação de calos organogênicos em gemas apicais de *Ginkgo biloba* cultivadas *in vitro*, em meio de cultura MS suplementado com variadas concentrações de ANA e zeatina.

Os resultados obtidos neste experimento evidenciam o efeito do BAP na indução de calos organogênicos de ginkgo. O efeito positivo do BAP na indução de calos em ginkgo também foi verificado por Tommasi e Scaramuzzi (2004), quando cultivaram gemas apicais e nodais obtidas de plântulas germinadas *in vitro*, em meio de cultura MS suplementado com ANA, na presença e ausência de extrato de endosperma. Montes-López e Rodríguez-de la O (2001) observaram que altas concentrações de BAP no meio de cultura induz a formação de calos na base das brotações de ginkgo obtidas de ápices caulinares.

A importância do BAP na formação de calos foi observado em macieira cultivar Gala RW1 por Morales et al. (1999), onde 72 % dos internódios cultivados na presença de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BAP produziram calos organogênicos.

Os calos de ginkgo formados nos diversos tratamentos apresentaram diferenças quanto à morfologia externa, no que se refere

à cor (branco-amarelado e verde) e à estrutura (aquoso e compacto nodulares). Os calos compactos nodulares apresentaram coloração verde clara, verde-escuros com nódulos meristemáticos e/ou com folhas. Narayanaswamy (1977 *apud* MANTOVANI, 1997), relata que a variação na estrutura e coloração dos calos pode ser observado em diferentes explantes de uma mesma espécie ou de diferentes espécies.

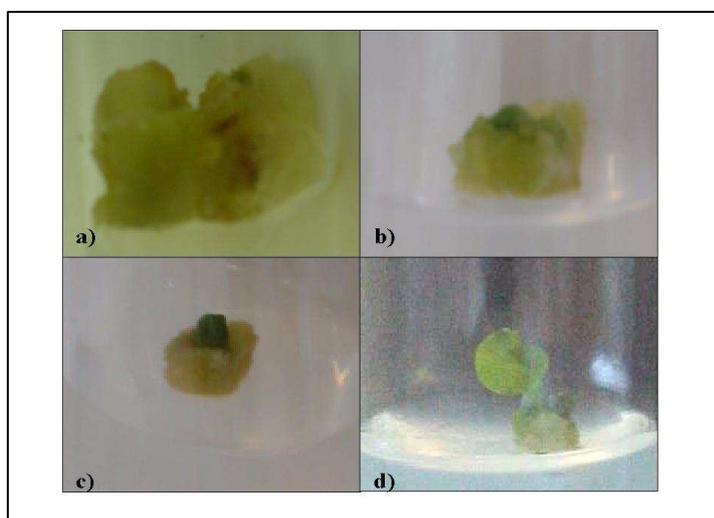
Conforme o mesmo autor, o tecido caloso procedente de diferentes espécies vegetais pode apresentar diferenças quanto à estrutura e hábito de crescimento. Pode ser classificado como branco, livre ou friável (que se separa facilmente), fino, aquoso (brando), duro, de fácil ou difícil separação. O calo organogênico apresenta pontos verdes que correspondem a centros meristemáticos capazes de regenerar plantas (NABORS et al., 1983) e o calo aquoso é feito de tecido translúcido, granular e macio, incapaz de regenerar plantas (WELTER et al., 1995).

Os calos aquosos, observados nesta primeira avaliação, apresentaram cor branco-amarelado (Figura 4), com estrutura externa esponjosa e tecido mais endurecido no seu interior, representando, provavelmente, parte do explante original. Estes calos não evoluíram no decorrer do tempo para formar novas estruturas morfogênicas e exibiram pouco crescimento e desenvolvimento. Ao longo dos subcultivos, os mesmos foram apresentando necrose.



**Figura 4.** Calo aquoso de *Ginkgo biloba*. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003.

Os calos que apresentaram nódulos e coloração verde foram considerados como organogênicos. Inicialmente, os mesmos exibiam tonalidade verde clara e levemente nodulares (Figura 5a). Gradativamente estes nódulos evoluíram, passando a formar nódulos maiores, supostamente meristemáticos de coloração verde mais intensa (Figura 5b-c), pois sendo que algumas destas estruturas originaram folhas (Figura 5d). Também foram observados calos nodulares de coloração verde-escuro.



**Figura 5.** Calos organogênicos de *Ginkgo biloba* obtidos em meio WPM na presença de reguladores de crescimento. a) calo nodular de coloração verde clara; b-c) calos com nódulos meristemáticos de coloração verde-escuro; d) calo com formação de folhas. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003.

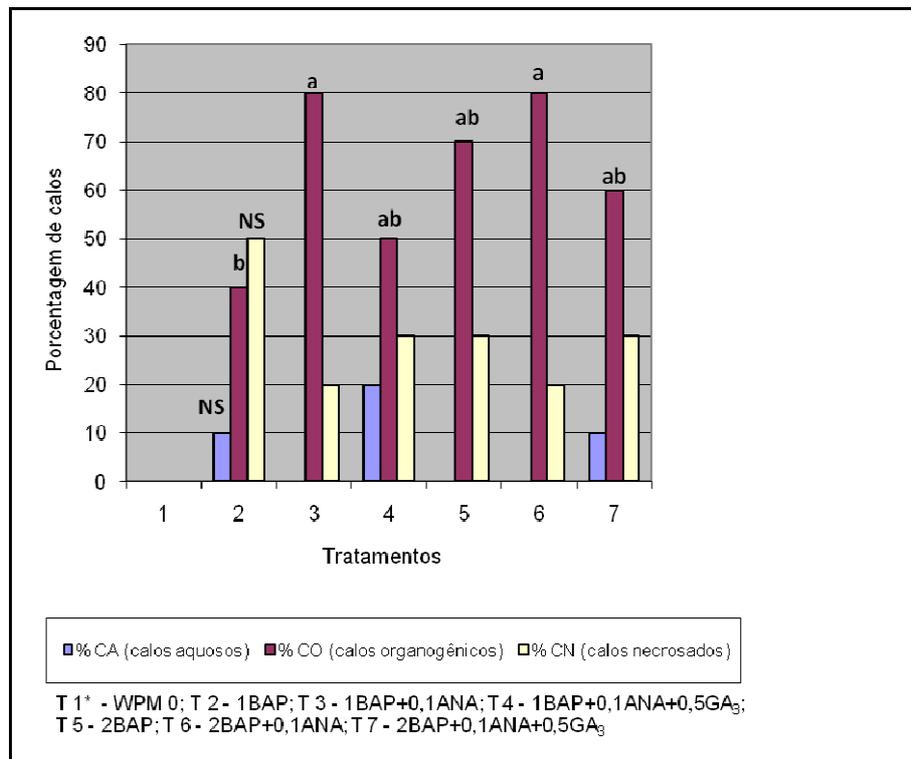
De acordo com Nabors et al. (1983), os pontos verdes que se desenvolvem nos calos podem corresponder a centros meristemáticos com capacidade de regenerar plantas e, portanto, podem ser chamados de organogênicos. Segundo Narayanaswamy (1977 *apud* MANTOVANI, 1997) e Bhojwani e Razdan (1983 *apud* MANTOVANI, 1997), estas estruturas são proliferações de células de tecido primário que, após sofrerem desdiferenciação, rediferenciam-se formando centros meristemáticos, denominados de meristemóides, que originam diferentes estruturas, como gemas vegetativas e raízes.

Aos 30 dias de cultivo, a frequência média de calos aquosos formados a partir do cultivo dos ápices caulinares foi de 5,7 %, variando de 0 a 20 % nos diferentes tratamentos (Figura 6). A porcentagem média de calos necrosados foi de 30 %, com variação de 0 a 50 %, não havendo diferença significativa entre os tratamentos para estas variáveis pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% (Apêndice 1).

No entanto, os tratamentos com fitorreguladores influenciaram a frequência de calos organogênicos. Cultivados nos meios 1BAP+0,1ANA (tratamento 3) e 2BAP+0,1ANA (tratamento 6), 80% dos explantes produziram este tipo de calo (Figuras 6 e 7). Estes tratamentos, segundo o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de significância, foram superiores ao tratamento 1, composto por meio sem reguladores de crescimento (Apêndice 1 e 2).

A combinação citocinina (BAP) e auxina (ANA) foi efetiva na formação de calos organogênicos em *Ginkgo biloba*. A adição de GA<sub>3</sub> no meio não se mostrou favorável na indução desse tipo de calo, visto que houve uma redução na frequência de calos

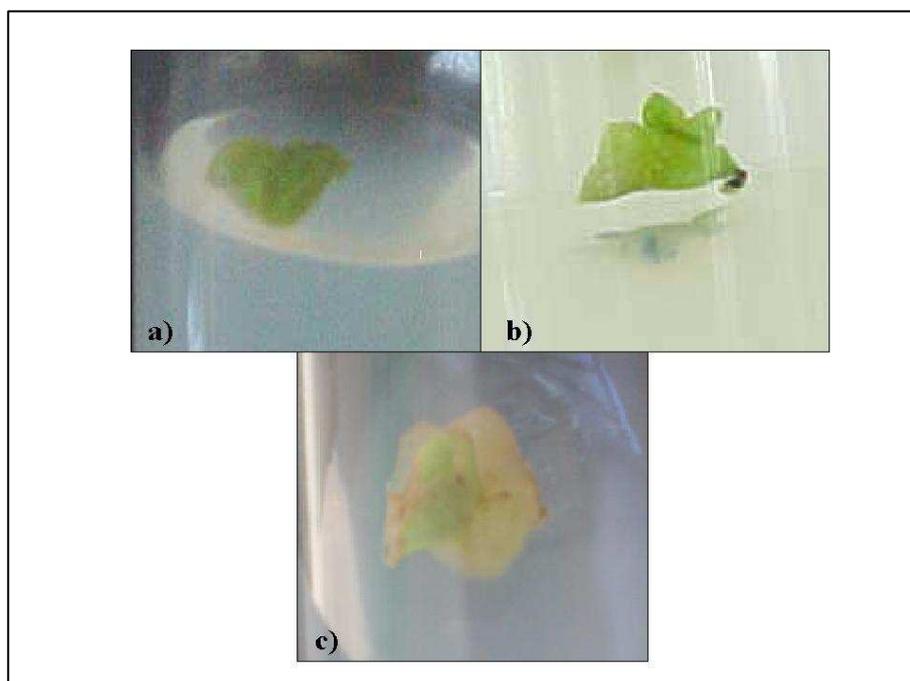
organogênicos quando este regulador foi adicionado ao meio (Figura 6).



NS-não significativo pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%.

**Figura 6.** Porcentagem de calos aquosos, organogênicos e necrosados formados a partir de ápices caulinares de *Ginkgo biloba* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes tratamentos do meio WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003.



**Figura 7.** Calos organogênicos de *Ginkgo biloba* observados aos 30 dias de cultivo *in vitro* no tratamento 3 (a e b) e no tratamento 6 (c). FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003.

Skoog e Miller (1957 *apud* MANTOVANI, 1997), relataram que a organogênese em explantes medulares de tabaco é regulada por interações quantitativas entre reguladores de crescimento, especialmente entre uma auxina e uma citocinina. Como observado neste experimento, a alta concentração de citocinina em relação à auxina induziu a produção de calos, ao invés de brotações, como demonstrado em tabaco por esses autores.

Tommasi e Scaramuzzi (2004) também obtiveram calos quando cultivaram gemas apicais e nodais de plântulas de ginkgo em meio MS suplementado com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA.

Em ginkgo, Huh et al. (2002) obtiveram maior número de gemas adventícias a partir de segmentos de caule cultivados em meio MS, com a mesma combinação de reguladores de crescimento (1BAP+0,1ANA) e suplementado com 5 % de carvão ativado. Choi et al. (2004) observaram formação de gemas adventícias em embriões zigóticos imaturos de ginkgo em meio MS suplementado com 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

O presente experimento demonstra que, em ginkgo, a presença de BAP combinado ou não com ANA, foi fundamental para a calogênese a partir de ápices caulinares, sendo que a frequência deste tipo de resposta seguiu um comportamento dependente do tipo e combinação hormonal entre citocinina/auxina/GA<sub>3</sub>.

Na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP (tratamento 2), a frequência de calos organogênicos foi de 40 %, sendo que esta passou para 70 % quando a concentração de BAP foi dobrada para 2 mg L<sup>-1</sup> (tratamento 5).

Quando a concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP foi combinada com ANA a frequência de calos organogênicos dobrou, passando de 40 % para 80 %. O aumento nesta frequência novamente foi observada quando utilizou-se 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP com ANA, sendo que a mesma passou de 70 % (2BAP) para 80 % (2BAP+0,1ANA) (Figura 8).

Estes resultados estão de acordo com as afirmações de Huetteman e Preece (1993), onde a presença de altas concentrações de citocininas no meio induz a excessiva formação de calos em explantes de espécies lenhosas.

Koroch et al. (2000) induziram calos organogênicos a partir de explantes foliares de echinácea (*Echinacea purpurea*), em meio básico MS suplementado com 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

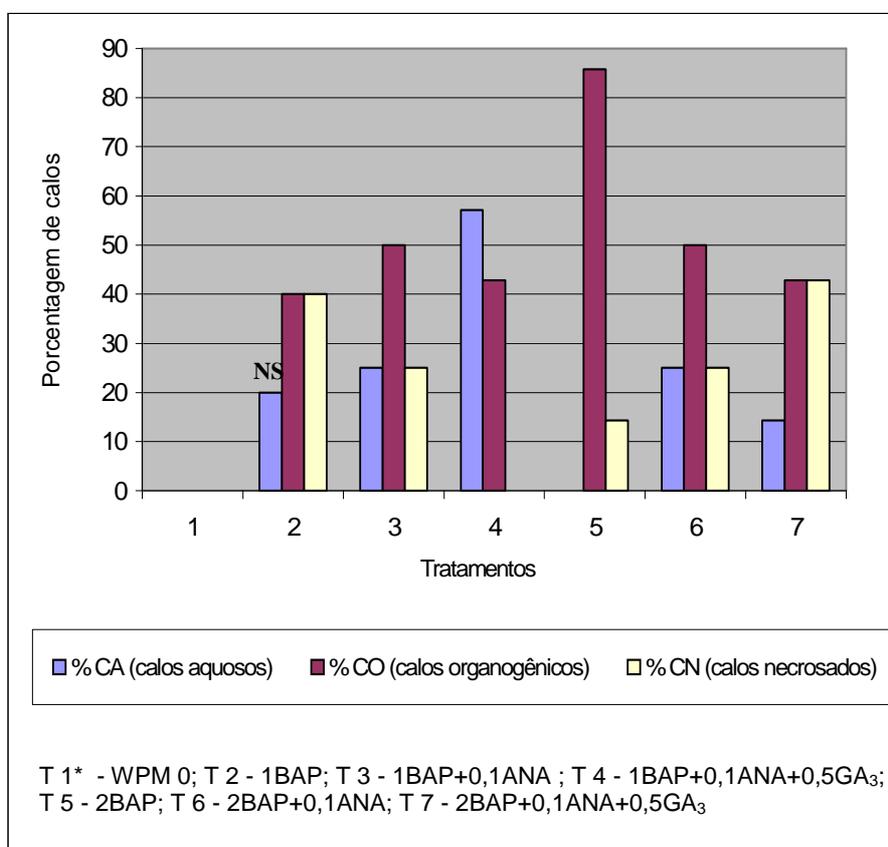
Da mesma forma, Mantovani et al. (1997) obtiveram formação de calos organogênicos em caixeta (*Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch), a partir de discos foliares cultivados em meio MS nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, e em combinações com ANA nas concentrações de 0,01 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>.

Estudos realizados por Martins et al. (2001, demonstraram que ápices caulinares de ginkgo inoculados no meio de cultura WPM suplementado com 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, promoveu a indução de calos organogênicos.

No presente trabalho em todas as combinações de BAP+ANA, quando se acrescentou o GA<sub>3</sub>, observou-se uma redução média na frequência de calos organogênicos na ordem de aproximadamente 30 % (Figura 8).

A ação inibitória do GA<sub>3</sub> também foi observada por Mello-Farias et al. (1996), onde a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> reduziu a produção de calos organogênicos em pereira, mesmo quando combinado com BAP e ANA. Geralmente o GA<sub>3</sub> é utilizado em meios de isolamento e multiplicação para promover o alongamento das brotações. Isso foi comprovado por Grandó et al. (2001), quando a presença de GA<sub>3</sub> induziu o alongamento de plântulas de *Paspalum notatum* e o aumento no número de embriões somáticos germinados *in vitro*.

Estatisticamente, em que pese as variações observadas, os meios de cultura não influenciaram no tipo de calo formado (Figura 8 e Apêndice 3). Em média 20,2 % dos explantes apresentaram calos aquosos, variando de 0 % a 57,1 %. Calos necrosados ocorreram em 24,5 % dos explantes, variando de 0 % a 42,9 %. A frequência média de calos organogênicos foi de 44,5 %, variando de 0 % a 85,7%.



NS-não significativo pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância.

**Figura 8.** Porcentagem de calos aquosos, organogênicos e necrosados formados a partir de ápices caulinares de *Ginkgo biloba* aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes tratamentos do meio WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003.

Tommasi e Scaramuzzi (2004) verificaram que a presença de ANA foi positiva na indução de calos organogênicos em ginkgo, a partir do cultivo de gemas apicais e nodais originados de plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro*. Porém este regulador não auxiliou na manutenção destes calos, pois os mesmos necrosaram ao longo do tempo. Tendência similar foi observado no presente experimento, em meios de cultura com 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP quando adicionado ANA (Figura 9).



**Figura 9.** Calos organogênicos de *Ginkgo biloba* induzidos no meio WPM suplementado com 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP (tratamento 5), observado aos 60 dias de cultivo *in vitro*. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003.

Embora a presença de GA<sub>3</sub> não tenha influenciado positivamente a indução de calos organogênicos aos 30 dias de cultivo, combinado com 1BAP+0,1ANA (tratamento 4), promoveu a sobrevivência e manutenção deste tipo de calo, visto que não houve necrose dos mesmos neste tratamento.

Com a finalidade de avaliar o desenvolvimento dos calos organogênicos, o diâmetro dos mesmos foram obtidos antes e depois da limpeza (retirada de setores necrosados) aos 30 e 60 dias.

A análise de variância mostrou diferença significativa no diâmetro dos calos induzidos entre os diferentes tratamentos avaliados

aos 30 dias de cultivo, mas não aos 60 dias (Apêndice 4). Aos 30 dias (Tabela 3), os tratamentos 3, 4 e 7 apresentaram maior crescimento no diâmetro inicial dos calos quando comparado com os demais (P=0,0013). Estes resultados indicam que a combinação de BAP+ANA+ GA<sub>3</sub>, promove o crescimento inicial dos calos. Já os calos limpos (diâmetro final), apresentaram em média, 0,76 cm de diâmetro, variando de 0,64 cm a 1,02 cm.

Aos 60 dias de cultivo o diâmetro médio inicial era de 1,10 cm e os calos limpos de 0,77 cm.

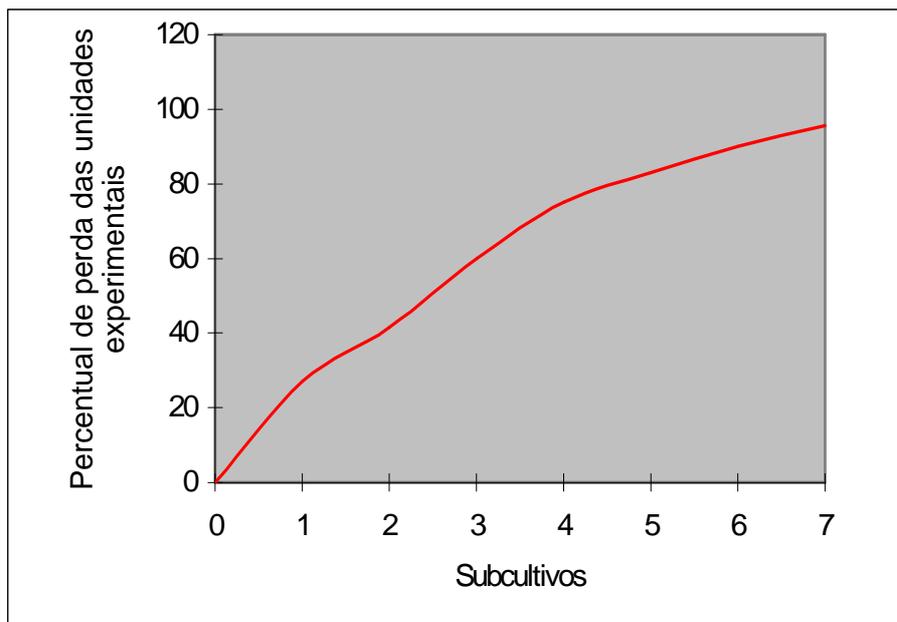
Os calos cresceram, em média, 0,34 cm de diâmetro durante 30 dias de cultivo, de 0,76 cm (30° dia) à 1,10 cm (60° dia).

**Tabela 3.** Diâmetro inicial e final (cm) dos calos organogênicos de *Ginkgo biloba* avaliados aos 30 e 60 dias de cultivo em diferentes tratamentos no meio WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003

Tratamentos	Dias de cultivo			
	30		60	
	Diâmetro (cm)		Diâmetro (cm)	
	Inicial	Final	Inicial	Final
(1) WPM 0	-	-	-	-
(2) 1BAP	0,97 c	0,68 <sup>ns</sup>	0,96 <sup>ns</sup>	0,77 <sup>ns</sup>
(3) 1BAP +0,1ANA	1,41a b	0,77	1,24	0,67
(4) 1BAP+0,1ANA+0,5GA <sub>3</sub>	1,71 a	1,02	0,88	0,61
(5) 2BAP	0,90 c	0,64	0,90	0,78
(6) 2BAP+0,1ANA	1,03 b c	0,66	1,23	1,06
(7) 2BAP+0,1ANA+0,5GA <sub>3</sub>	1,42 a b	0,81	1,45	0,50
<b>Média</b>	1,25	0,76	1,10	0,77
<b>C.V. %</b>	27,43	40,71	29,58	58,33

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.  
ns- não significativo a 5% de significância.

A cada novo subcultivo realizado, após os 60 dias, as unidades experimentais foram sendo perdidas devido à necrose dos calos, sendo que no sétimo subcultivo, aos 210 dias, restaram apenas 5 unidades experimentais de todo o experimento, o que representa aproximadamente 96 % de perda de material em função da necrose dos calos (Figura 10). Assim, devido à redução do número de repetições, não foi possível analisar as avaliações realizadas nos subcultivos subsequentes.



**Figura 10.** Porcentagem de perdas de unidades experimentais por necrose ao longo dos subcultivos de calos organogênicos de *Ginkgo biloba*. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003

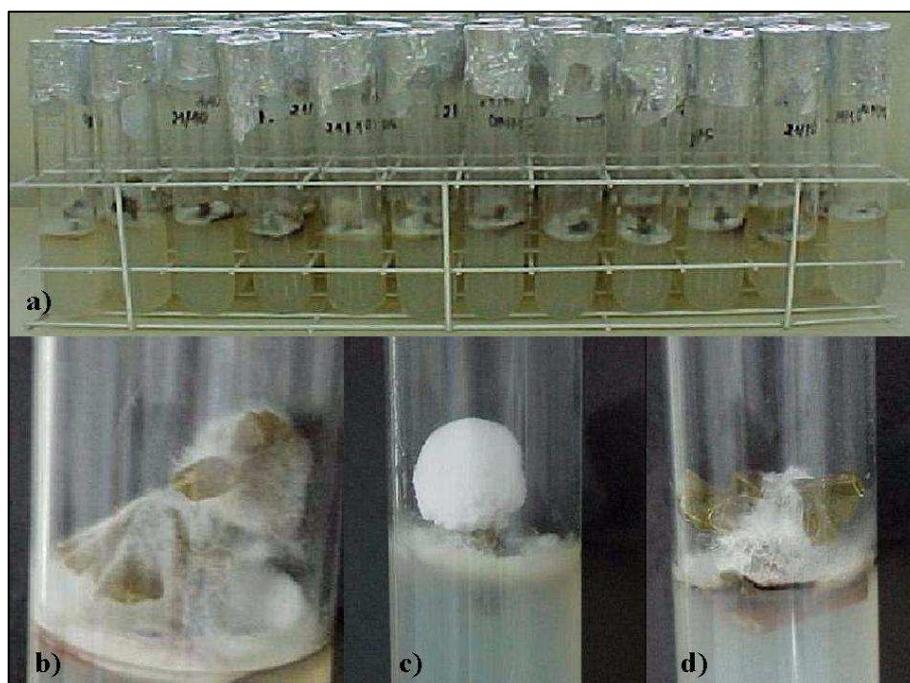
A morte de um tecido é precedida pela descoloração, desidratação e perda de sua organização celular (CIB, 2005).

De acordo com Taiz e Zeiger (2004), a necrose está relacionada a um conjunto de alterações morfológicas que caracterizam morte celular provocada por dano físico, intoxicação ou outra lesão externa. Pode atingir células isoladas, áreas de um tecido ou órgãos inteiros (NECROSE, 2005).

A alta perda de unidades experimentais pode estar relacionada com a insuficiência do meio nutritivo e combinações de reguladores utilizadas, já que as mesmas podem não ser as mais adequadas para sustentar o crescimento dos calos e desenvolvimento dos nódulos verdes em gemas; também pela necessidade de se realizar subcultivos mais freqüentes (a cada quinze dias); pela toxidez gerada dos reguladores e componentes no meio; pelo excesso de luz, ou ainda pela própria indução do calo de ginkgo. Assim, a necrose é um dos problemas a serem contornados para indução da organogênese com sucesso nesta espécie.

Os segmentos nodais de *Ginkgo biloba* mostraram-se completamente contaminados com fungos após cinco dias de cultivo em todos os tratamentos (Figura 11a). Contudo foi possível observar a emissão e o desenvolvimento de folhas (Figura 11b).

A identificação dos fungos contaminantes foi realizada pelo Laboratório de Fitopatologia da UPF, identificados como pertencentes aos gêneros *Alternaria* e *Fusarium* (Figura 11c-d).



**Figura 11.** Contaminações fúngicas em segmentos nodais de *Ginkgo biloba* aos cinco dias de cultivo. a) contaminação em 100 % das unidades experimentais; b) segmento nodal contaminado mostrando abertura e desenvolvimento das folhas; c) contaminação por fungo *Alternaria*; d) contaminação por fungo *Fusarium*. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003.

Os resultados indicam que a assepsia dos segmentos nodais foi ineficiente. A ação dos desinfetantes (álcool e hipoclorito de sódio) se dá superficialmente sobre o tecido do explante e não foram eficazes no controle da contaminação exógena, provavelmente devido ao tamanho e complexidade do mesmo, especialmente por apresentar tecidos muito lignificados que dificultam a penetração dos agentes desinfestantes.

Segundo Montes-López e Rodríguez-de la O (2001), a descontaminação do explante de ginkgo é um processo bastante

difícil, sendo que o problema mais sério é a contaminação por fungos. Para contornar o problema os autores aplicaram um pré-tratamento dos explantes com fungicida ( $1\text{g L}^{-1}$  de Benomil) e ainda adicionaram fungicida ao meio de cultura ( $400\text{ mg L}^{-1}$  de Benomil). Este último procedimento afeta o desenvolvimento dos tecidos cultivados *in vitro* e, portanto, deve ser realizado por um curto período de tempo.

### **3.2 Experimento II**

Após cinco dias na fase de escuro, a perda foi total dos ápices caulinares obtidos de árvore adulta em seis dos dez tratamentos (1, 2, 3, 4, 9 e 10), em decorrência de contaminação por bactéria, classificada como endofítica, aeróbia e gram positiva, não sendo possível avaliar estes tratamentos.

Segundo Carvalho et al. (1990), entre os vários fatores que afetam a obtenção de plantas micropropagadas destaca-se a contaminação do material vindo do campo. Gemas apicais e axilares do caule, que constituem os explantes utilizados nesta técnica, abrigam uma grande variedade de microflora endógena - fungos e bactérias que persistem mesmo após a desinfestação dos materiais em laboratório. De acordo com Leifert et al. (1991 *apud* MANTOVANI, 1997), a condição fitossanitária da planta doadora influencia o processo de desinfestação dos explantes, sendo este mais crítico quando as plantas matrizes são coletadas a campo, e não mantidas em ambientes protegidos.

A contaminação foi mais acentuada no experimento com segmentos nodais de *Ginkgo biloba*, no qual foi observado 100 % de

perda em todos os tratamentos, devido a ocorrência de contaminações fúngicas como observado no experimento 1.

Mesmo tendo sido realizado o enxágüe com os fungicidas carbendazin e hiprodiona durante a assepsia, o pré-tratamento dos explantes com estes fungicidas não foi suficiente e efetivo para o controle da contaminação fúngica.

Depois de realizada a análise em laboratório, os fungos novamente foram identificados como sendo dos gêneros *Alternaria* e *Fusarium*. Segundo Fortes (informação pessoal), para se ter sucesso no cultivo de segmentos nodais, os mesmos devem ser retirados de plantas já cultivadas *in vitro*, com a finalidade de evitar este tipo de contaminação.

Montez-López e Rodríguez-de la O (2001) verificaram que o principal problema observado no estabelecimento asséptico de ápices caulinares de *Ginkgo biloba* deu-se a partir da presença dos fungos *Alternaria* e *Rhizoctonia*, fator este constatado basicamente devido à procedência do material vegetal utilizado, uma árvore cultivada no campo, sem nenhum tipo de tratamento prévio. Segundo Pierik (1990) há maior possibilidade de infecção da planta matriz, quando a mesma encontra-se em contato direto com as fontes de contaminação.

Uma hipótese a ser levantada, é que parte das contaminações são devidas à época de coleta dos explantes. No caso da ginkgo, durante a queda das folhas (outono) e no inverno, os primórdios foliares apresentam-se recobertos por uma camada mais cerosa, a qual impede a desinfestação e permite maior acúmulo de contaminantes externos, por causa do formato de roseta (HAROLD et

al. 1989 *apud* MONTEZ-LÓPEZ & RODRÍGUEZ-de la O, 2001). Conforme Mroginski et al. (1997), a época de cultivo que apresenta os melhores resultados e a menor taxa de contaminação em espécies lenhosas são os meses quentes (janeiro e fevereiro).

Passados 30 dias após a inoculação, observou-se que os tratamentos 5, 6, 7 e 8 (2BAP; 2BAP+0,1ANA; 2BAP+0,1ANA+0,5GA<sub>3</sub>; 0,5BAP) haviam induzido calos (Figura 14).

Os calos formados nos diferentes tratamentos apresentaram diferenças quanto à morfologia externa. Essas diferenças foram observadas quanto à cor (branco-amarelado e verde) e a estrutura (aquoso e compacto nodulares). Os calos compacto nodulares apresentavam coloração verde clara e verde-escuros, com nódulos meristemáticos. Os aquosos eram de cor branco-amarelado (Figura 13), com estrutura externa esponjosa e tecido mais endurecido no interior. Estes calos não desenvolveram-se ao longo do tempo.



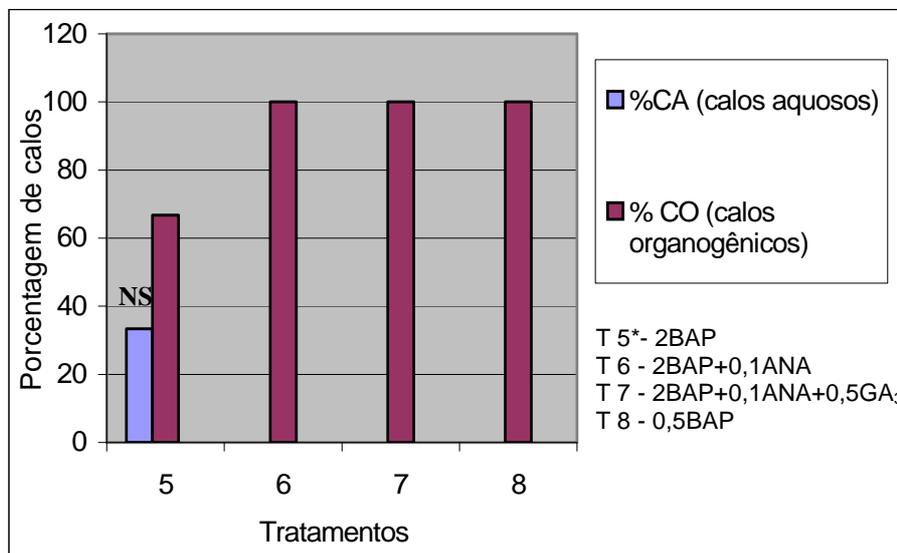
**Figura 12.** Calo aquoso de *Ginkgo biloba*. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

Os calos com nódulos e coloração verde clara e escura foram considerados organogênicos (Figura 13a). Gradativamente, evoluíram para calos verde-escuros com gemas (Figura 13b).



**Figura 13.** Calos organogênicos de *Ginkgo biloba*. a) calo inicial verde claro; b) calo verde-escuro com gemas. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

Aos 30 dias de cultivo, a porcentagem de calos formados, nos quatro tratamentos, foi de 100 %. A formação de calos aquosos foi somente observado no tratamento 5 (2BAP), na frequência de 33,3 %. Quanto aos calos organogênicos, 91,7 % dos explantes produziram este tipo de calo, variando de 66,7 % a 100 % nos tratamentos 5, 6, 7 e 8, sendo que não foi constatado calos necrosados no primeiro mês de cultivo (Figura 12). Não houve diferença significativa entre os diferentes tipos de calos através do teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância (Figura 14) (Apêndice 5).



NS-não significativo pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância.  
T \* - tratamento

**Figura 14.** Porcentagem de calos aquosos e organogênicos formados a partir de ápices caulinares de *Ginkgo biloba* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes tratamentos do meio WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

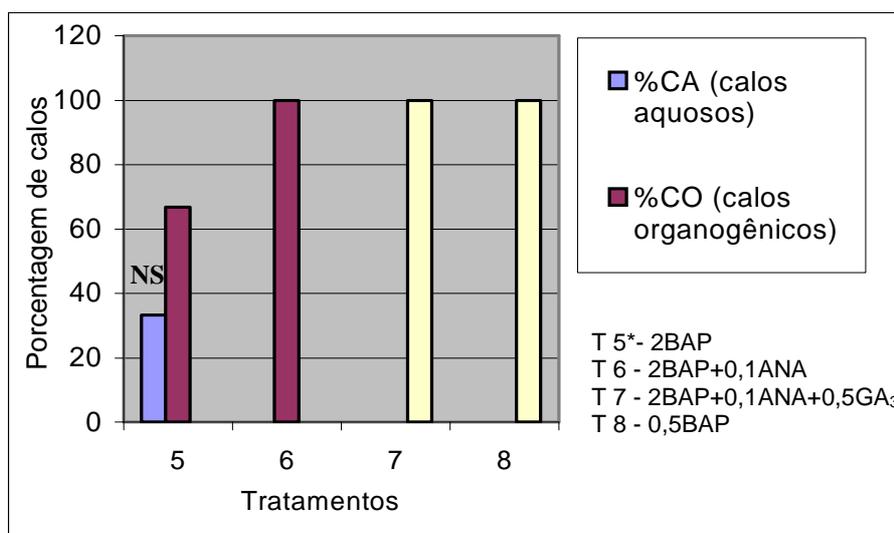
Tommasi e Scaramuzzi (2004), verificaram a indução de calos organogênicos verde-escuros em ginkgo, quando cultivaram gemas apicais e nodais obtidos de plântulas germinadas *in vitro* em meio de cultura MS suplementado com 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, combinado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA e extrato de endosperma.

Calos organogênicos também foram obtidos a partir de discos foliares de ginkgo cultivados em meio MS reduzido pela metade e suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,001 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D aos 30 dias de cultivo (GOLLE et al., 2003).

A Figura 15 mostra a frequência de calos observados aos 60 dias de cultivo. As frequências de calos induzidos nos tratamentos

5 e 6 permaneceram as mesmas porém, nos tratamentos 7 e 8, que aos 30 dias apresentavam 100 % de calos organogênicos, transformaram-se em calos necrosados. Não houve possibilidade de realizar a análise estatística dos dados, neste período devido ao reduzido número de repetições restantes.

A concentração de 0,5 BAP no tratamento 8, induziu a formação de 100 % de calos organogênicos aos 30 dias de cultivo, porém os mesmos não sobreviveram até o segundo subcultivo. Provavelmente a baixa concentração de BAP pode não ter sido suficiente para manter o desenvolvimento dos mesmos. A adição do GA<sub>3</sub> também levou a necrose dos calos no segundo subcultivo.



NS-não significativo pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância.

T \* - tratamento

**Figura 15.** Porcentagem de calos aquosos e organogênicos formados a partir de ápices caulinares de *Ginkgo biloba* aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes tratamentos do meio WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

Brito et al. (1995) e Nerartavis e Miranda (1985 *apud* MANTOVANI 1997), no cultivo *in vitro* de *Capraria biflora* e *Anacardium occidentale*, demonstraram que na combinação de BAP com ANA foi possível não só promover maior formação de calos organogênicos, a partir de discos foliares, como também induzir maior crescimento dos mesmos e aumentar a capacidade morfo genética.

Não foi possível observar diferença estatística para a variável diâmetro de calo organogênico entre os tratamentos aos 30 e 60 dias de cultivo (Tabela 4) (Apêndice 5).

Após 30 dias de cultivo, os calos iniciais mediram em média 0,75 cm, variando de 0,46 cm a 0,95 cm, mantendo as medidas após efetuada a limpeza.

Aos 60 dias, a média foi de 0,79 cm ( $P=0,5254$ ), variando de 0,73 cm a 0,85 cm no diâmetro inicial, e 0,55 cm no diâmetro final ( $P=0,5509$ ), sendo constatado uma perda de 50% no diâmetro dos calos aos 60 dias. Porém, apenas avaliou-se os tratamentos 5 e 6, devido à necrose ocorrida nos tratamentos 7 e 8.

Os calos organogênicos dos tratamentos 5 e 6 (Figura 16a-b), mantiveram-se até o terceiro e quarto subcultivos, quando posteriormente necrosaram e secaram, não permitindo a regeneração de plantas.

**Tabela 4.** Diâmetro inicial e final (cm) dos calos organogênicos de *Ginkgo biloba* avaliados aos 30 e 60 dias de cultivo em diferentes tratamentos no meio WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004

Tratamentos	Dias de cultivo			
	30		60	
	Diâmetro (cm)		Diâmetro (cm)	
	Inicial	Final	Inicial	Final
(5) 2BAP	0,78 <sup>ns</sup>	0,75 <sup>ns</sup>	0,85 <sup>ns</sup>	0,60 <sup>ns</sup>
(6) 2BAP+0,1ANA	0,95	0,95	0,73	0,51
(7) 2BAP+0,1ANA+0,5GA <sub>3</sub>	0,80	0,80	-	-
(8) 0,5BAP	0,46	0,46	-	-
Média	0,75	0,75	0,79	0,55
C.V. %	46,96	49,95	25,39	23,97

ns- não significativo pela ANOVA



**Figura 16.** Calos organogênicos de *Ginkgo biloba* aos 60 dias de cultivo. a) calo obtido no tratamento 5 (2BAP); b) calo obtido no tratamento 6 (2BAP+0,1ANA). FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

#### 4 CONCLUSÕES

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos, pode-se concluir que:

1. O explante ápice caulinar apresenta potencial morfogênético para a micropropagação;
2. Na ausência de reguladores de crescimento os ápices caulinares desenvolveram a brotação e houve a expansão de pequenas folhas a partir do desenvolvimento de meristemas pré-existentes;
3. A presença de BAP é fundamental para a indução de calogênese e a combinação de citocinina (BAP) e auxina (ANA) favoreceu a formação de calos organogênicos aos 30 dias de cultivo;
4. Segmentos nodais obtidos de planta matriz crescida em condições de campo não são explantes ideais para o estabelecimento de culturas *in vitro*, devido ao alto grau de contaminação fúngica;
5. Explantes obtidos de árvore adulta cultivada em campo aberto apresentam elevado nível de contaminação fúngica;
6. O uso de altas concentrações de BAP combinado ou não com ANA, favorecem a indução de calos organogênicos e sobrevivência dos mesmos por 60 dias;
7. A necrose dos calos ao longo dos subcultivos impediu a regeneração de plantas.

## CAPÍTULO II

### REGULADORES DE CRESCIMENTO, ADITIVOS NUTRICIONAIS E MEIOS BÁSICOS NO CULTIVO *IN VITRO* DE ÁPICES CAULINARES DE *Ginkgo biloba* L.

**Paloma Alves da Silva Sexto<sup>1</sup>; Magali Ferrari Grandó<sup>2</sup>; Alexandre Augusto Nienow<sup>3</sup>; Delvino Nolla<sup>4</sup>**

**RESUMO** - A *Ginkgo biloba* é uma planta de importância ornamental e medicinal e por apresentar dificuldades quanto a reprodução sexual fora do local de origem, a técnica de cultivo *in vitro* surge como uma alternativa para propagação vegetativa. No entanto, poucas informações sobre protocolos de micropropagação são relatadas, principalmente referentes ao cultivo *in vitro* a partir de ápices caulinares obtidos de plantas jovens e adultas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência dos reguladores de crescimento benzilaminopurina (BAP 0 e 1 mg L<sup>-1</sup>), ácido naftalenoacético (ANA 0 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>), ácido indolacético (AIA 0 e 1 mg L<sup>-1</sup>) e cinetina (CIN 0 e 1 mg L<sup>-1</sup>), e aditivos nutricionais como os aminoácidos de

---

<sup>1</sup> Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>., Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

<sup>2</sup> Orientadora, Bióloga, Ph.D., professora de Genética, Biotecnologia e Biologia Molecular da FAMV-ICB/UPF.

<sup>3</sup> Co-orientador, Eng. Agr., Dr., professor de Fruticultura e Silvicultura da FAMV/UPF.

<sup>4</sup> Eng. Agr., M.Sc., professor de Plantas Medicinais da FAMV/UPF.

Norstog, L-prolina e caseína hidrolisada, bem como meios básicos na resposta dos ápices caulinares cultivados *in vitro*. Foram realizados dois experimentos com ápices caulinares inoculados no meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações e combinações dos reguladores de crescimento e aditivos nutricionais, e no meio de cultura MS e WPM, na ausência de reguladores de crescimento. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com dez (experimento 1) e doze (experimento 2) repetições por tratamento, sendo a unidade experimental constituída de um tubo de ensaio contendo um explante. Para avaliação da resposta *in vitro*, as seguintes características foram avaliadas aos 30 e 60 dias de cultivo: formação e tipo de calo, número de gemas/calos e peso dos calos. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o programa estatístico SAS (Statistic Analysis System) e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade. Comparou-se os dados referentes ao tipo de calo, pelo valor da média  $\pm$  1 desvio padrão. Aos 30 dias de cultivo, 100 % dos ápices caulinares formaram calos, independente da combinação de reguladores de crescimento e da presença de aditivos nutricionais. Os meios suplementados com as combinações de 1BAP+0,1ANA com ou sem aditivos nutricionais e 1BAP+1AIA sem aditivos, produziram maior frequência de calos organogênicos (100 %), evidenciando a importância da combinação citocinina e auxina na produção deste tipo de calo. No entanto, aos 60 dias de cultivo, a frequência de calos organogênicos foi superior no meio suplementado com 1CIN+1AIA+L-prolina+ caseína hidrolisada, indicando que esses componentes foram efetivos na sobrevivência dos calos organogênicos. O maior número de gemas por calo (1,6) foi

obtido aos 30 dias no meio MS+1BAP+0,1ANA+Aa Norstog. Os calos organogênicos apresentaram uma taxa de crescimento em torno de aproximadamente 300 mg no período de 30 dias. Os meios básicos de cultura, sem reguladores de crescimento (experimento 2), induziram o desenvolvimento dos ápices caulinares e formação de brotações sem passar pela fase de calo. Aos 30 dias as brotações apresentaram, em média, 0,23 cm de comprimento, sendo que o meio MS induziu maior frequência de brotação e número de folhas por explante comparado com o meio WPM.

**Palavras-chave:** Medicinal, Morfogênese, Propagação de plantas, Calogênese.

**GROWTH REGULATORS, NUTRITIONAL ADDITIVE AND  
BASIC MEDIA IN *IN VITRO* CULTURE OF *Ginkgo biloba* L.  
SHOOT-TIPS**

**Paloma Alves da Silva Sexto<sup>1</sup>; Magali Ferrari Grando<sup>2</sup>; Alexandre  
Augusto Nienow<sup>3</sup>; Delvino Nolla<sup>4</sup>**

**ABSTRACT** - *Ginkgo biloba* is an important ornamental and medicinal plant and because the sexual reproduction difficulties out of its local origin, the *in vitro* culture comes as an alternative for its vegetative propagation. However, few information about micropropagation protocols are reported, mainly referent to the *in vitro* culture of shoot-tips obtained from young and adult plants. The present study had the aim to evaluate the influence of growth regulators benzilaminopurine (BAP 0 and 1.0 mg L<sup>-1</sup>), naftalenoacetic acid (NAA 0 and 0.1 mg L<sup>-1</sup>), indolacetic acid (IAA 0 and 1.0 mg L<sup>-1</sup>) and kinetin (KIN 0 and 1.0 mg L<sup>-1</sup>) and nutritional additive as the Norstog Amino acids, L-proline and casein hidrolysate, as well basic

---

<sup>1</sup> Agronomist, Master student in Agronomy Graduation Program, Major in Plant Production at Department of Agronomy and Veterinarian Medicine – University of Passo Fundo (FAMV/UPF).

<sup>2</sup> Adviser, Biologist, Ph.D., professor of Genetics, Biotechnology and Molecular Biology, FAMV-ICB/UPF.

<sup>3</sup> Co-adviser, Agronomist, Dr., professor of Fruit and Silviculture, FAMV/UPF.

<sup>4</sup> Agronomist, M.Sc., professor of Herbal plants of FAMV/UPF.

salt media, in the response of the shoot-tips cultured *in vitro*. In this way, it were carried out 2 experiments with shoot-tips inoculated in the culture media MS, supplemented with different concentrations and combinations of growth regulators and nutritional additives, and in the culture media WPM, in the absence of growth regulators. It was used the randomized blocks experimental delineation with ten (experiment 1) and twelve (experiment 2) replications per treatment, and the experimental unit consisted in the test tube having one explant. To evaluate the response *in vitro*, it was analyzed the following characteristics: formation and type of callus, number of bud/callus and weight of callus. The data were submitted to the ANOVA (Statistic Analysis System) and the difference among the average compared by Duncan test at 5 % of probability. The data referring to the type of callus were compared by the media value  $\pm 1$  standard deviation. After 30 days of culture, 100 % of shoot-tips formed callus, independent of the growth regulators combination and the presence of nutritive additives. The media supplemented with the combination 1BAP+0,1ANA with or without nutritional addicts and 1BAP+1ANA without addicts produced the higher frequency of organogenic calli (100 %), making evident the importance of cytokinin and auxin combination in this type of callus production. The largest number of shoots per callus (1,6) was rached at 30 days of cultivation on medium MS+1BAP+0,1ANA+ Aa Norstog. However, at 60 days of culture, the frequency of organogenic callus was superior in the media supplemented with 1KIN+1ANA+L-pro+CH, indicating that this combination and the nutritional addicts were effective in the survival of organogenic callus. The number of buds produced by callus was in

average of 0,25 in 30 to 60 days of culture. The organogenic callus had presented a growth rate of 300 mg in 30 days period. Basic culture media with no supplement of growth regulators (experiment 2) induced the development of shoot-tips and shoot formation without passing by the callus phase. At 30 days of culture, the shoot developed presented, in average, 0,23 cm long, and the MS medium induced higher frequency of shooting and larger number of leaves per explants compared with WPM medium.

**Key-words:** Medicinal, Morphogenesis, Plant propagation, Calogenesis.

## 1 INTRODUÇÃO

*Ginkgo biloba* é a única espécie sobrevivente às bombas lançadas sobre Hiroshima e Nagasaki durante a II guerra mundial. Pertencente a família Ginkgoaceae, é nativa da China e considerada como árvore ornamental favorita na arborização de parques e ruas de numerosas cidades do oriente (O'Reilly, 1993 *apud* DUPRÉ et al., 2000).

Esta espécie apresenta dificuldades quanto à reprodução sexual pois, além de necessitar de plantas masculinas e femininas para a fecundação e polinização, as sementes apresentam baixa taxa de germinação e não são viáveis por longo tempo (Tommasi et al., 1999 *apud* TOMMASI & SCARAMUZZI, 2004).

Existem poucas informações sobre protocolos de micropropagação de ginkgo, principalmente partindo de ápices caulinares de plantas adultas. O uso de diferentes misturas complexas no meio de cultura, como extrato de leveduras, leite ou água de coco, caseína hidrolisada ou glutamato, tem sido relatado no cultivo *in vitro* de *Ginkgo biloba* (TOMMASI & SCARAMUZZI, 2004).

Os meios básicos MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD & McCOWN, 1980), têm sido utilizados com sucesso por vários autores para a propagação de diferentes espécies lenhosas (Oliveira et al., 1996 *apud* PAIVA et al., 1997), sendo a concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura fator determinante para o crescimento e desenvolvimento dos explantes (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). As auxinas, como o ácido indolacético (AIA) e o ácido naftalenoacético (ANA), e as citocininas,

como o benzilaminopurina (BAP) e a cinetina (CIN), adicionadas ao meio de cultura em diferentes combinações e concentrações, podem promover a indução de diferentes respostas morfogênicas, assim como a regeneração de plantas, visto que cada espécie, genótipo e explante apresentam diferentes requerimentos nutricionais.

Embora a micropropagação de espécies lenhosas seja considerada uma técnica viável, um dos grandes problemas enfrentados é a contaminação dos explantes *in vitro*, principalmente quando se trabalha com material vegetal proveniente do campo, dificultando e, em certos casos, inviabilizando o processo (ABREU & PEDROTTI, 2003).

Tendo em vista o estabelecimento futuro de um protocolo para regenerar plantas de *Ginkgo biloba*, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de ápices caulinares em diferentes meios de cultura MS e WPM, acrescidos com várias combinações de auxinas, citocininas e aditivos nutricionais.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi conduzido em dois experimentos, no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo-RS. No primeiro experimento foram cultivados, em meio MS suplementado com diferentes reguladores de crescimento e aditivos nutricionais, ápices caulinares obtidos da planta matriz jovem da FAMV/UPF, no período de outubro e dezembro de 2004. No segundo, explantes de ápices caulinares coletados de uma planta matriz jovem, foram cultivados em dois meios de cultura, MS e WPM,

sem reguladores de crescimento, no período de dezembro de 2004 a fevereiro de 2005.

## **2.1 Experimento I**

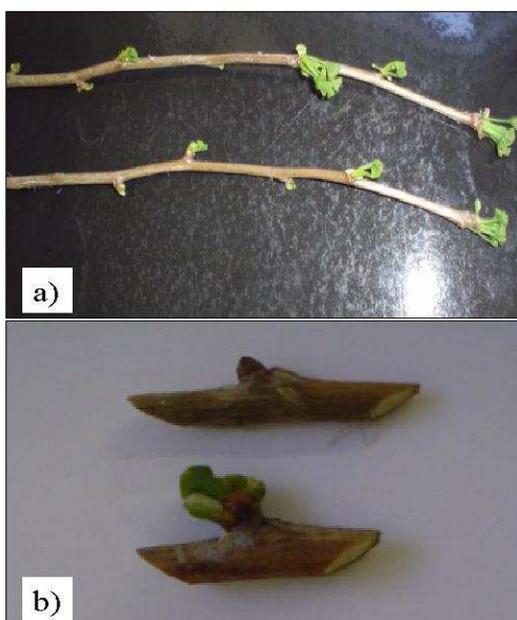
### **2.1.1 Cultivo de ápices caulinares de matriz jovem de *Ginkgo biloba* em diferentes meios de cultura suplementados com reguladores de crescimento e aditivos nutricionais**

Inicialmente, efetuou-se um pré-tratamento fitossanitário na planta matriz localizada no Campus I da UPF, através de quinze pulverizações quinzenais com o fungicida sistêmico cupravit azul BR (oxiclureto de cobre na concentração de 12,5 g por litro de água) (Figura 1).



**Figura 1.** Tratamento fitossanitário na planta matriz de *Ginkgo biloba* com oxiclureto de cobre. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

Posteriormente, coletou-se estacas de 15 cm de comprimento da planta matriz, sendo estas posteriormente seccionadas em segmentos de 1,5 cm de comprimento para retirada dos ápices caulinares (Figuras 2a-b).



**Figura 2.** Material utilizado como explante de *Ginkgo biloba*. a) estacas de *Ginkgo biloba* com 15 cm de comprimento; b) segmentos de 1,5 cm de comprimento para retirada de ápices caulinares. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

Em câmara de fluxo laminar, os segmentos foram imersos com álcool 70 % por 5 minutos, seguido de solução de hipoclorito de sódio 1,5 % (50 % do produto comercial Mazzarolo) com pH ajustado para 5,8, acrescido de 3 gotas de tween 20 por 100 mL de água, sob agitação por 20 minutos. A seguir, foi realizada uma tríplice lavagem com água destilada/deionizada e autoclavada. A retirada dos ápices caulinares foi realizada com o auxílio de uma lupa estereoscópica de

35x de aumento, pinças e bisturis previamente esterilizados, e imediatamente os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25x150mm) contendo 15 mL de meio de cultura.

Os explantes foram cultivados em meio básico MS, com nove variações e combinações dos reguladores de crescimento BAP (benzilaminopurina), ANA (ácido naftalenoacético), AIA (ácido indolacético) e CIN (cinetina). Suplementou-se os meios de cultura com os aminoácidos de Norstog, L-prolina, caseína hidrolisada (Tabela 1), os quais constituíram os tratamentos. Todos os meios foram acrescidos de sacarose 30 g L<sup>-1</sup>, ágar 6,0 g L<sup>-1</sup> (marca comercial Merck) e vitaminas (tiamina - aumentada de 0,1 mg L<sup>-1</sup> para 1 mg L<sup>-1</sup>; ácido nicotínico 0,5 mg L<sup>-1</sup> e piridoxina 0,5 mg L<sup>-1</sup>), tendo o pH ajustado para 5,8 com HCl a 0,1 N antes da autoclavagem dos meios.





**Tabela 1.** Combinações de reguladores de crescimento e aditivos nutricionais em meio básico MS para cultivo de ápices caulinares de *Ginkgo biloba*. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004

Tratamentos	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	CIN (mg L <sup>-1</sup> )	ANA (mg L <sup>-1</sup> )	AIA (mg L <sup>-1</sup> )	Aa Norstog* (mg L <sup>-1</sup> )	L-prolina+Caseína hidrolisada 2,88g L <sup>-1</sup> + 100 mg L <sup>-1</sup>
(1) MS+1BAP+0,1ANA	1,0	0,0	0,1	0,0	- **	-
(2) MS+1BAP+0,1ANA+Aa Norstog	1,0	0,0	0,1	0,0	+ ***	-
(3) MS+1BAP+0,1ANA+L-pro+CH	1,0	0,0	0,1	0,0	-	+
(4) MS+1BAP+1AIA	1,0	0,0	0,0	1,0	-	-
(5) MS+1BAP+1AIA+Aa Norstog	1,0	0,0	0,0	1,0	+	-
(6) MS+1BAP+1AIA+ L-pro+CH	1,0	0,0	0,0	1,0	-	+
(7) MS+1CIN+1AIA	0,0	1,0	0,0	1,0	-	-
(8) MS+1CIN+1AIA+Aa Norstog	0,0	1,0	0,0	1,0	+	-
(9) MS+1CIN+1AIA+ L-pro+CH	0,0	1,0	0,0	1,0	-	+

\* Aminoácidos (Aa) de Norstog= composição dos aminoácidos (Anexo 1)

\*\* - = ausência dos aditivos nutricionais indicados

\*\*\* + = presença dos aditivos nutricionais indicados

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com dez repetições, sendo cada repetição constituída de um tubo de ensaio contendo um ápice caulinar.

Após a permanência por cinco dias no escuro, manteve-se os ápices caulinares em ambiente de luz e temperatura controlados (fotoperíodo de 16 horas luz/dia a  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  e luminância de  $\pm 25\text{ mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

A primeira avaliação foi realizada aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Para cada avaliação, considerou-se os seguintes aspectos: formação e tipo de calo, diâmetro dos calos (medição do calo retirado diretamente do tubo de ensaio), número de gemas por calo, peso inicial (após a retirada dos calos do tubo de ensaio) e final dos calos organogênicos (após limpeza do mesmo e retirada dos setores necrosados). Para avaliar o diâmetro dos calos, foram medidos os dois diâmetros transversais determinando a média. Subcultivos e avaliações foram realizadas a cada 30 dias.

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o programa estatístico SAS (Statistic Analysis System) e as médias comparadas pelo teste Duncan a 5 % de significância. Os dados referentes ao tipo de calo foram comparados pelo valor da média  $\pm 1$  desvio padrão.

## **2.2 Experimento II**

### **2.2.1 Cultivo de ápices caulinares de matriz jovem de *Ginkgo biloba*, em dois meios de cultura, na ausência de reguladores de crescimento e aditivos nutricionais**

Ápices caulinares foram retirados de estacas semilenhosas coletadas da planta matriz jovem e seccionadas em segmentos de 1,5 cm de comprimento.

A assepsia dos explantes foi realizada como descrito no experimento anterior. Os ápices caulinares foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de isolamento MS e WPM na ausência de reguladores de crescimento e aditivos nutricionais (Tabela 2).

**Tabela 2.** Composição dos meios de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD e McCOWN, 1980). FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004

<b>Componentes</b>	<b>MS (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>WPM (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1650,0	400,0
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1900,0	-
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	6,2	6,2
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	170,0	170,0
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	-	990,0
<b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	-	556,0
<b>KI</b>	0,83	-
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>	0,25	0,25
<b>CoCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O</b>	0,025	-
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	440,0	96,0
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	370,0	370,0
<b>MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	-	22,3
<b>MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	22,3	-
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	8,6	8,6
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	0,025	0,25
<b>Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O</b>	37,3	37,3
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	27,8	27,8
<b>Tiamina</b>	0,1	1,0
<b>Ácido nicotínico</b>	0,5	0,5
<b>Piridoxina</b>	0,5	0,5

Os meios foram suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6,0 g L<sup>-1</sup> de ágar (marca comercial Merck) e pH ajustado para 5,8 com HCl a 0,1 N antes da autoclavagem dos meios.

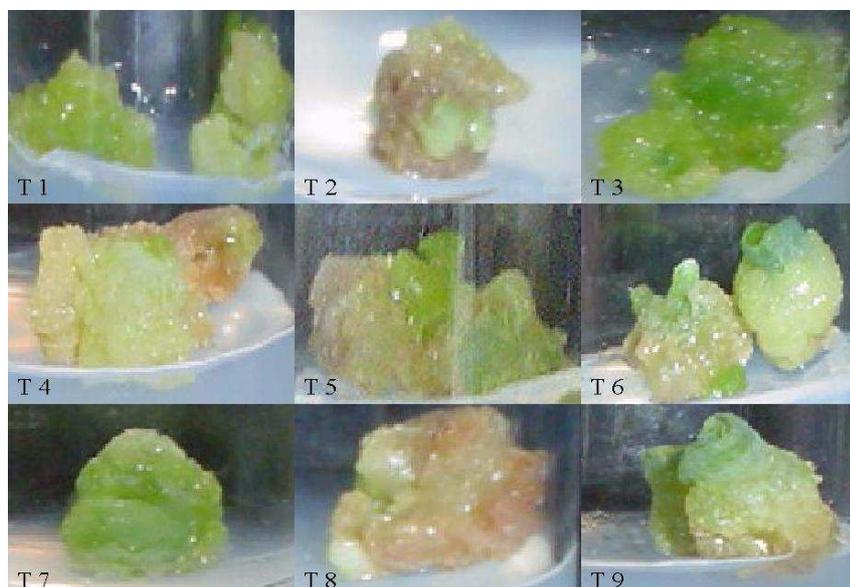
As condições de cultivo e as avaliações realizadas se igualam as descritas no experimento 1, sendo que para este experimento foram realizadas doze repetições por tratamento.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Experimento I**

Aos 30 dias de cultivo, observou-se a indução de calos em todos os ápices caulinares nos nove tratamentos. A Figura 3 mostra o aspecto dos calos obtidos nos diferentes tratamentos.

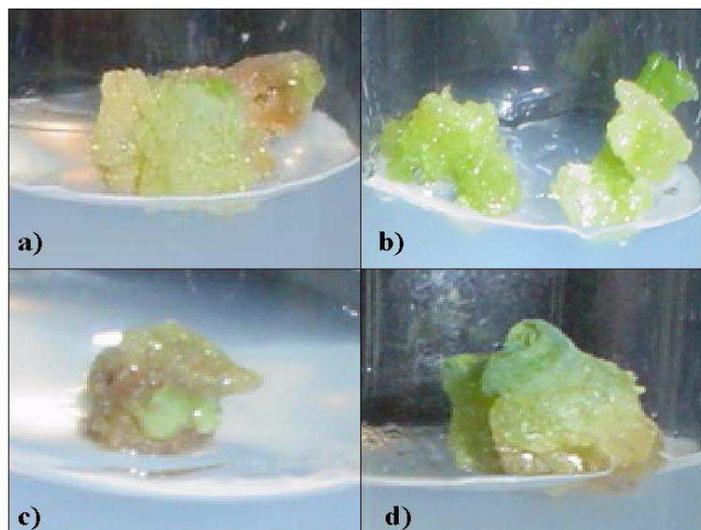
Os calos formados nos diferentes tratamentos apresentaram diferenças quanto à morfologia externa, em relação à cor (verde claro e verde-escuro) e estrutura (esponjosos e compacto nodulares). Os calos compactos nodulares apresentavam coloração verde-escura, com nódulos meristemáticos e gemas e/ou folhas.



T1\* -MS+1BAP+0,1ANA; T2 - MS+1BAP+0,1ANA+AaNorstog; T3 T1\*-MS+1BAP+0,1ANA;T2-MS+1BAP+0,1ANA+AaNorstog;T3-MS+1BAP+0,1ANA+L-pro+CH;T4-MS+1BAP+1AIA;T5-MS+1BAP+1AIA+AaNorstog;T6-MS+1BAP+1AIA+L-pro+CH;T7-MS+1CIN+1AIA;T8-MS+1CIN+1AIA+AaNorstog;T9-MS+1CIN+1AIA+L-pro+CH  
T\* - tratamento

**Figura 3.** Calos de *Ginkgo biloba* induzidos após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento e aditivos nutricionais. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

Inicialmente os mesmos exibiam tonalidade verde clara e aspecto pouco nodular (Figura 4a). Gradativamente foram evoluindo para calos organogênicos verde-escuros, formando nódulos meristemáticos e gemas na superfície (Figura 4b-c), sendo que algumas destas estruturas iniciaram a emissão de folhas (Figura 4d).



**Figura 4.** Calos organogênicos de *Ginkgo biloba* obtidos em meio MS, na presença de reguladores de crescimento e aditivos nutricionais. a) calo nodular de coloração verde clara; b) calo com nódulos meristemáticos de coloração verde-escura; c) calo com indução de gemas; d) calo com formação de folhas. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

De acordo com Abreu e Pedrotti (2003), o crescimento e desenvolvimento dos meristemas e gemas axilares são normalmente lentos até 30 dias após a inoculação.

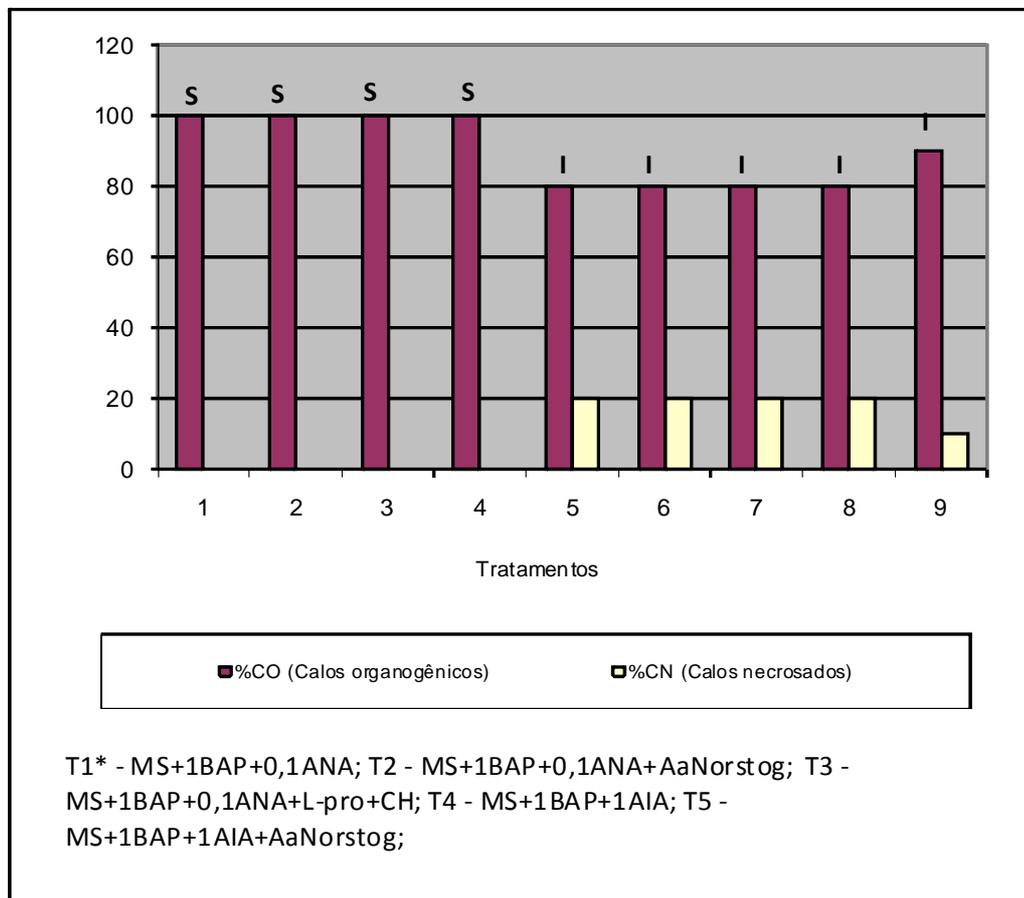
O pré-tratamento fitossanitário realizado com o fungicida oxiclureto de cobre mostrou-se efetivo no controle dos fitopatógenos endógenos, visto que após cinco dias de cultivo no escuro os ápices caulinares apresentavam-se saudáveis. Segundo Panick (1995), a aplicação de fungicidas nos talos das plantas doadoras de explantes tem se mostrado efetivo na redução de contaminações *in vitro*.

A formação de calo ocorreu em 100 % dos ápices caulinares, indicando que a presença de citocinina combinada com auxina no meio de cultura, foi eficiente na indução da calogênese em *Ginkgo biloba*. Conforme Koroch et al. (2000), o balanço ideal entre auxina/citocinina requerido para a indução e formação de calos organogênicos é determinado pela espécie.

Quanto a frequência de calos organogênicos observados aos 30 dias de cultivo, os tratamentos de 1, 2, 3 e 4 foram superiores aos demais, produzindo 100 % de calos organogênicos (Figura 5).

Estes resultados indicam que os tratamentos contendo 1BAP+0,1ANA (com e sem suplementos aditivos), bem como 1BAP+1AIA (sem aditivos), foram os mais eficientes na indução de calos organogênicos, os quais apresentam potencial de regeneração de plantas. Já a adição dos aditivos nutricionais (Aa Norstog, L-prolina+caseína hidrolisada) não influenciaram esta variável. Os dados também sugerem que o uso de cinetina, tanto combinado com ANA como com AIA, foram menos eficientes na indução de calos organogênicos.

A frequência média de calos necrosados foi de 10 %, variando de 0 a 20 %, conforme o tratamento (Figura 5), não havendo influência dos tratamentos.



Média + desvio padrão= superior (S)

Média - desvio padrão= inferior (I)

Desvio padrão da frequência de calos organogênicos= 10,0

Desvio padrão da frequência de calos necrosados= 10,69

T\* - tratamento

**Figura 5.** Porcentagem de calos organogênicos e necrosados obtidos de ápices caulinares de *Ginkgo biloba* cultivados em diferentes meios de cultura por 30 dias. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

Em ginkgo, Tommasi e Scaramuzzi (2004), observaram a formação de uma grande proporção de calos organogênicos verde-escuros a partir de gemas apicais obtidas de plântulas germinadas *in vitro*, cultivadas em meio cultura MS, suplementado com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de

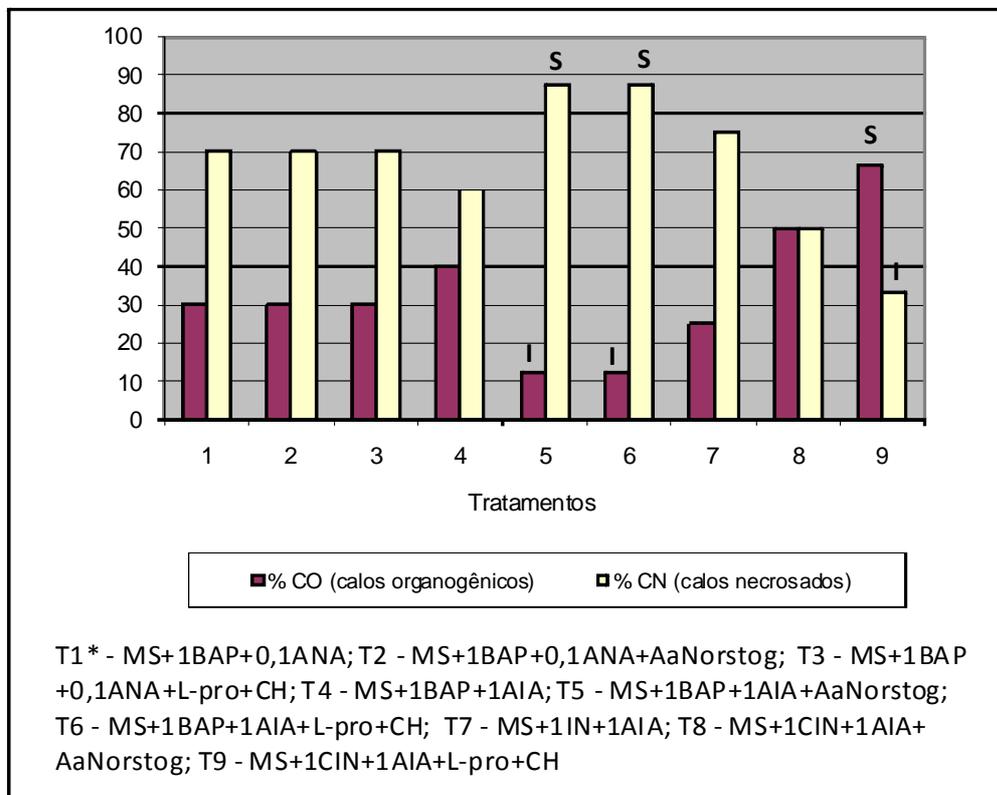
BAP ou CIN + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, com e sem suplementação de extrato de endosperma. Estes autores discutem o efeito positivo do ANA na frequência e tamanho dos calos nesta espécie.

Huh et al. (2002) testaram várias concentrações de BAP combinado com ANA e carvão ativado em meio básico MS, onde o cultivo de segmentos de caule de ginkgo foi melhor na combinação 1 mg L<sup>-1</sup> BAP+ 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,5 % carvão ativado, obtendo 68% de brotações. Ao contrário do que foi obtido por estes autores, somente calos foram obtidos utilizando a mesma concentração e combinação de reguladores de crescimento no presente experimento. No entanto, é sabido que o carvão ativado utilizado pelos autores pode reduzir a formação de calos.

O uso da combinação citocinina+auxina na indução de calos foi relatada por outros autores. Camper et al. (1997), visando a extração de compostos medicinais *in vitro*, obtiveram formação de calos embriogênicos em ginkgo, após cinco semanas de cultivo de embriões e tecidos cotilenodares em meio MS, suplementado com 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1 a 3 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Os explantes oriundos de tecidos cotiledonares produziram maior percentual deste tipo de calo com uma variação entre 90 e 100 %.

Aos 60 dias de cultivo, verificou-se grande perda dos calos por necrose (66,7 %). A frequência de calos necrosados nos tratamentos 5 e 6 foi de 87,5 %, sendo este valor superior aos demais tratamentos (Figura 6). Já no tratamento 9 somente 33,3 % dos calos se apresentaram necrosados, sendo este valor inferior aos demais tratamentos. Em consequência, também se mostrou superior aos demais na frequência de calos organogênicos (66,7 %), indicando que

a combinação de CIN+AIA+L-prol+CH foi mais efetiva na manutenção e sobrevivência de calos organogênicos de *Ginkgo biloba* (Figura 6).



Média + desvio padrão= superior (S)

Média - desvio padrão= inferior (I)

Desvio padrão da frequência de calos organogênicos= 17,33

Desvio padrão da frequência de calos necrosados= 17,57

T\* - tratamento

**Figura 6.** Porcentagem de calos organogênicos e necrosados de *Ginkgo biloba* observados aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes tratamentos do meio MS. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

Estes resultados concordam com Tommasi e Scaramuzzi (2004), que obtiveram a maior frequência na produção de gemas de ginkgo quando cultivaram ápices caulinares de plântulas jovens em meio MS + 1 mg L<sup>-1</sup> de CIN + 1 mg L<sup>-1</sup> de AIA + extrato de endosperma, meio semelhante ao utilizado nesse experimento. Estes autores também demonstraram a importância do uso de aditivos

nutricionais (extrato de endosperma de ginkgo) no cultivo de gemas caulinares de ginkgo. Na ausência do extrato de endosperma, somente calos foram obtidos, sendo que nenhuma brotação foi observada. Já a adição do extrato permitiu a produção de calos e desenvolvimento de brotações.

No presente estudo, devido a indisponibilidade do extrato de endosperma, outros aditivos nutricionais foram testados, como a combinação de aminoácidos de Norstog, L-prolina e caseína hidrolisada.

Os aminoácidos de Norstog foram desenvolvidos e utilizados para o cultivo de embriões imaturos por Norstog (1973) em cereais, pois os mesmos são muito exigentes nutricionalmente. A L-prolina provou ter efeito positivo na indução de calos embriogênicos em milho (Armstrong & Green, 1985 apud VARNIER, 2004), aumentando a frequência em 23 %, quando utilizado na concentração de 2,88 g L<sup>-1</sup>. A caseína hidrolisada é uma mistura não definida de proteínas, que ocasionalmente é usada na preparação dos meios de cultura com a finalidade de melhorar a resposta morfogênica dos explantes (KYTE & KLEYN, 1996).

Para visualizar melhor o efeito positivo dos aditivos nutricionais combinados com 1CIN+1AIA na sobrevivência dos calos organogênicos, pode-se comparar as frequências de calos organogênicos obtidos nos tratamento 7 (25 %), tratamento 8 (50 %) e tratamento 9 (66,7 %) (Figura 6). Portanto, a suplementação dos Aa Norstog aumentou em 100 % e a combinação L-prolina + caseína hidrolisada aumentou em 164 % a frequência de calos organogênicos

de ginkgo quando comparado aos meios sem aditivos nutricionais (T7).

No entanto, o efeito positivo dos suplementos nutricionais na manutenção dos calos organogênicos, não foi observado em outras combinações de reguladores de crescimento (1BAP+0,1ANA) (tratamentos 1, 2 e 3), podendo ter sido, inclusive, negativo em algumas combinações (1BAP+1AIA) (tratamentos 5, 6 e 7) (Figura 6).

Hao et al. (2000) estudaram o efeito de vários fatores no crescimento e desenvolvimento de gemas axilares de ginkgo *in vitro*, concluindo que o meio MS suplementado com 500 mg L<sup>-1</sup> de CH, na ausência de reguladores, foi o que induziu maior desenvolvimento das gemas axilares, resultando na regeneração de plantas por organogênese direta.

De acordo com Thorpe (1981 *apud* MANTOVANI, 1997), misturas complexas de variedades de extratos, como suplementos de aminoácidos, caseína hidrolisada, L-prolina, glutamina, malte de extratos, água e leite de coco, suco de laranja e tomate, têm sido utilizadas nas mais diversas preparações de meios de cultura, obtendo expressivos resultados.

Guerra et al. (1993), realizaram o cultivo *in vitro* de pró-embriões zigóticos de *Pinus elliottii* e *Araucaria angustifolia*, em meio e MS, suplementados com 45 mgL<sup>-1</sup> de glutamina + 500 mgL<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, em variadas combinações de reguladores de crescimento 2,4-D, BAP e CIN. O uso de glutamina+caseína hidrolisada permitiu a regeneração e o estabelecimento de plantas *in vitro* dessas espécies.

O número de gemas observados nos calos organogênicos foi avaliado aos 30 e 60 dias de cultivo. Aos 30 dias os calos produziram, em média, 0,25 gemas/calos. O tratamento 2 (MS+1BAP+0,1ANA+Aa Norstog) produziu 1,6 gemas/calos, sendo superior aos demais tratamentos pelo teste de Duncan a 5 % de significância (Tabela 3) (Figura 7).

Em média, aos 60 dias, observou-se uma formação de 0,26 gemas/calos, variando de 0 (tratamento 5) a 0,77 (tratamento 9) gemas/calos, sendo que a análise de variância não indicou diferença entre os tratamentos (P=0,6520) (Tabela 3 e Apêndice 7).

**Tabela 3.** Número de gemas formadas por calo organogênico de *Ginkgo biloba* aos 30 e 60 dias de cultivo em diferentes tratamentos no meio MS. Passo Fundo-RS, FAMV/UPF, 2004

Tratamentos	Número de gemas formadas por calo organogênico	
	Dias de cultivo	
	30	60
(1) MS+1BAP+0,1ANA	0,10 b	0,40 <sup>BS</sup>
(2) MS+1BAP+0,1 ANA+Aa Norstog	1,60 a	0,10
(3) MS+1BAP+0,1ANA+L-pro+CH	0,50 b	0,50
(4) MS+1BAP+1AIA	0,00 b	0,10
(5) MS+1BAP+1AIA+Aa Norstog	0,00 b	0,00
(6) MS+1BAP+1AIA+L-pro+CH	0,10 b	0,12
(7) MS+1CIN+1AIA	0,00 b	0,12
(8) MS+1CIN+1AIA+Aa Norstog	0,00 b	0,25
(9) MS+1CIN+1AIA+L-pro+CH	0,00 b	0,77
<b>Média</b>	0,25	0,26
<b>C.V. %</b>	447,68	331,72

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.



**Figura 7.** Calos organogênicos de *Ginkgo biloba* com formação de gemas nos tratamentos 2 e 3 (MS+1BAP+0,1ANA+Aa Norstog; MS+1BAP+0,1ANA+L-pro+CH) aos 30 dias de cultivo *in vitro*. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

Quanto à influência da combinação de reguladores utilizados no presente experimento, pode-se observar que, aos 30 dias de cultivo, os meios contendo 1BAP+0,1ANA com e sem aditivos e 1BAP+1AIA sem aditivos se destacaram na frequência de calos organogênicos induzidos, e o meio 1BAP+0,1ANA+Aa Norstog se destacou no número de gemas produzidas por calo. No entanto, aos 60 dias de cultivo a maior frequência de calos organogênicos (e menor necrose) e ainda o maior número de gemas (embora não significativo) foi observada no meio contendo 1CIN+1AIA+L-pro+CH (tratamento 9). Isso indica que, os meios apontados como mais eficientes na indução de calos aos 30 dias não mantiveram seu perfil aos 60 dias, e que ao longo dos subcultivos a combinação cinetina, ácido indolacético, L-polina e caseína hidrolisada suportam melhor a manutenção dos calos organogênicos de ginkgo.

O cultivo de ápices caulinares de plântulas de ginkgo geradas *in vitro* (TOMMASI & SCARAMUZZI, 2004) concluíram

que o BAP, principalmente combinado com ANA, leva a formação de calos com brotos, mas os brotos não se desenvolvem. Já a combinação de CIN+AIA promove o desenvolvimento das brotações, o que não foi observado no presente experimento.

Segundo Caldas et al. (1990), existem diferenças entre as citocininas, sendo que o BAP induz a formação de um grande número de brotos e alta taxa de multiplicação em sistemas de micropropagação, enquanto que a kinetina permite apenas o crescimento normal sem brotações múltiplas. A cinetina é um regulador isolado do DNA, que é utilizado em cultura de tecidos para promover a divisão celular (KYTE & KLEYN, 2001).

No entanto Pierik (1990), observa que as citocininas geralmente estimulam a divisão celular principalmente se acompanhadas de uma auxina. O mesmo autor ressalta que concentrações mais elevadas de citocininas ( $1-10 \text{ mg L}^{-1}$ ) promovem a formação de brotos adventícios, devido ao fato de diminuírem a dominância apical.

Abreu e Pedrotti (2003), obtiveram, em média, 3,0 a 5,0 gemas por calo induzido de ápices caulinares de porta-enxerto de macieira M9 (*Malus pumilla* M.) em meio de cultura MS, suplementado com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. Morales et al. (1999), obtiveram 14,0 gemas por calo organogênico obtidos de internódios de macieira cultivar Gala cultivados em meio de cultura MS, suplementado com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP +  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA.

Essas comparações demonstram que *Ginkgo biloba* não apresenta alto potencial de produção de brotações múltiplas quando comparadas com outras espécies. As avaliações realizadas aos 30 e 60

dias nos calos organogênicos proporcionaram a visualização da formação de folhas em alguns calos. Estas folhas eram atípicas, sem pecíolos, com a lâmina foliar surgindo diretamente sobre o calo (Figura 8).



**Figura 8.** Calos organogênicos de *Ginkgo biloba* com formação de folhas nos tratamentos 6 e 9 (MS+1BAP+1AIA+L-pro+CH; MS+1CIN +1AIA+L-pro+CH) aos 30 dias de cultivo *in vitro*. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

Também avaliou-se aos 30 e 60 dias de cultivo, o peso inicial e final dos calos organogênicos formados e subcultivados nos nove tratamentos.

Em média, aos 30 dias de cultivo os calos pesaram 232,83 mg (peso inicial), com uma variação de 174,12 a 304,40 mg. Após efetuada a limpeza dos mesmos (peso final), a média do peso dos calos foi de 123,37 mg, variando de 111,50 a 138,58 mg, não havendo diferenças significativas entre os diferentes tratamentos ( $P=0,4621$  e  $P=0,9996$ ) (Tabela 4 e Apêndice 8). Neste primeiro cultivo, observou-se uma perda média de massa celular fresca de 109,46 mg (diferença entre o peso inicial e final dos calos) devido a retirada das regiões necrosadas dos calos.

Aos 60 dias, os calos organogênicos inicialmente pesaram em média, 420,75 mg e, após a limpeza, este peso médio passou a ser 77,74 mg. Não constatou-se diferenças significativas entre os tratamentos para peso inicial e final ( $P=0,6144$  e  $P=0,8850$ , respectivamente) (Tabela 4 e Apêndice 8).

Em média, os calos organogênicos apresentaram uma taxa de crescimento dos 30 para os 60 dias de cultivo, em torno de aproximadamente 300 mg. Embora essa taxa de crescimento represente um aumento de ~300%, observou-se que a maior parte desta massa celular apresentava-se necrosada. A limpeza dos calos ocasionou uma redução no peso dos mesmos de 420,75 para 77,74 mg aos 60 dias de cultivo (Tabela 4). Portanto, a perda de massa celular foi de 343,01mg devido necrose. Essa perda foi mais acentuada aos 60 dias que aos 30.



**Figura 9.** Aspecto geral dos calos necrosados de *Ginkgo biloba*. a) calo organogênico parcialmente necrosado aos 30 dias de cultivo; b) calo necrosado aos 60 dias de cultivo. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

**Tabela 4.** Peso inicial e final (mg) dos calos organogênicos de *Ginkgo biloba* aos 30 e 60 dias de cultivo em diferentes tratamentos no meio MS. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004

Tratamentos	Dias de cultivo			
	30		60	
	Peso (mg)		Peso (mg)	
	Inicial	Final	Inicial	Final
(1) MS+1BAP+0,1ANA	199,3 <sup>ns</sup>	111,5 <sup>ns</sup>	809,9 <sup>ns</sup>	99,0 <sup>ns</sup>
(2) MS+1BAP+0,1ANA+Aa Norstog	174,1	130,2	696,0	77,7
(3) MS+1BAP+0,1ANA+L- pro+CH	249,5	120,9	532,2	160,9
(4) MS+1BAP+1AIA	304,4	122,9	354,6	101,5
(5) MS+1BAP+1AIA+Aa Norstog	238,5	115,6	233,2	22,1
(6) MS+1BAP+1AIA+L-pro+CH	281,3	138,9	614,1	13,0
(7) MS+1KIN+1AIA	214,5	130,6	206,0	121,3
(8) MS+1KIN+1AIA+Aa Norstog	223,9	115,9	304,5	40,1
(9) MS+1KIN+1AIA+L-pro+CH	213,4	125,4	225,1	40,4
<b>Média</b>	232,8	123,4	420,85	77,74
<b>C.V. %</b>	54,93	71,44	108,92	153,95

ns- não significativo pela ANOVA

A figura 9a e b mostra aspectos da necrose dos calos de ginkgo aos 30 e 60 dias de cultivo. Devido ao crescente processo de necrose dos calos, não foi possível avaliar e manter o crescimento dos mesmos ao longo do tempo. No que se refere ao peso dos calos, as diferentes concentrações, tipos de reguladores de crescimento e presença de aditivos nutricionais não apresentaram influência no crescimento dos mesmos.

Camper et al. (1997), obtiveram sucesso no estabelecimento de calos embriogênicos de ginkgo a partir de embriões cultivados *in vitro*. Após cinco semanas de cultivo, observaram uma variação de peso fresco entre 569 e 535 mg em meio de cultura MS suplementado com 0,5 e 0,99 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, respectivamente. Na pesagem de explantes de cotilédones, o peso fresco apresentou uma baixa variação entre 233 e 266 mg na combinação de 2,99 mg L<sup>-1</sup> de ANA + 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Em *Ginkgo biloba*, alta frequência de necrose também foi relatada por Montes-López e Rodríguez-de la O (2001), quando cultivaram ápices caulinares em meio de cultura MS suplementado com 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

A ocorrência de necrose em explantes e calos de *Eucalyptus grandis* cultivados *in vitro*, também foi um problema observado por Picoli et al. (2005). Estes autores obtiveram uma redução da necrose e conseqüentemente o aumento da frequência de calos pela adição dos antibióticos carbenicilina e timentin, na concentração de 600 mg L<sup>-1</sup>, em meio de cultura. Nesta espécie, a necrose também pôde ser reduzida pela manutenção das culturas no escuro. Lainé e David (1994), induziram a formação de calos saudáveis em *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus grandis* mantendo-os cultivados em longos períodos de escuro. Esta estratégia também pode ser utilizada para futuros experimentos com *Ginkgo biloba*.

Segundo Montes-López e Rodríguez-de la O (2001) a *Ginkgo* é uma espécie de difícil propagação vegetativa. A maioria dos experimentos e relatos na literatura dizem respeito ao cultivo *in vitro* de tecidos jovens contendo células embrionárias ou meristemáticas

como embrião, tecido cotiledonar e ápice caulinar obtido de plântulas jovens de sementes germinadas *in vitro* (CAMPER et al., 1997; CHOI et al. 2004; TOMMASI & SCARAMUZZI, 2004).

Esses autores contrastaram o comportamento de ápices nodais e apicais obtidos de sementes germinadas de plântula *in vitro*. No geral, as gemas apicais produzem mais calos e brotações, enquanto que ápices provenientes de plantas adultas produziram baixa frequência de brotações (20 %) em comparação com ápices obtidos de plântulas jovens (80 %). Mesmo em explantes obtidos de plântula, as brotações múltiplas foram raras e os ápices somente desenvolveram brotações em meio suplementado com extrato de endosperma. Na ausência deste, somente calos foram obtidos, como o presente experimento.

### **3.2 Experimento II**

Ápices caulinares provenientes da planta matriz jovem residencial foram cultivados nos meios de cultura MS e WPM, na ausência de reguladores de crescimento, com a finalidade de comparar o desenvolvimento dos mesmos nesses meios, visto que em experimentos realizados anteriormente (capítulo I) o meio WPM desprovido de reguladores de crescimento induziu o desenvolvimento de brotações e folhas diretamente do explante sem passar pela fase de calo.

Aos 15 dias de cultivo, observou-se que a taxa de sobrevivência dos ápices caulinares cultivados foi de 100% nas 12 repetições dos dois tratamentos, sendo que nenhum explante

apresentou-se contaminado ou oxidado. A oxidação costuma ser um problema comum observado nos tecidos cultivados de lenhosas devido à produção de fenóis (HUH & WANG, 1983; WILKIN & DOODS, 1999).

Aos 15 dias de cultivo os ápices caulinares apresentavam aspecto saudável, coloração verde, mas a maioria se encontravam ainda “fechados” (Figura 10). Alguns ápices já apresentavam formação de pequenas brotações (Figura 11a-b) e, em ambos os meios de cultura, não houve o desenvolvimento de calogênese.



**Figura 10.** Aspectos dos ápices caulinares de *Ginkgo biloba* aos 15 dias de cultivo em meio de cultura WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2005.



**Figura 11.** Aspecto do desenvolvimento dos ápices caulinares de *Ginkgo biloba* e formação de brotações aos 15 dias de cultivo. a) Meio de cultura MS; b) meio de cultura WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2005.

Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, verificou-se que alguns ápices caulinares desenvolveram brotações sem passar pela fase de calo, iniciando o processo de morfogênese direta. A indução de brotações diretamente sem passar pela fase de calo também foi obtida anteriormente em outros experimentos realizados quando se utilizou meio básico sem reguladores de crescimento.

No meio MS, 33,3 % dos ápices apresentaram brotações, sendo que somente 8,3 % dos cultivados no meio WPM apresentaram este comportamento, sendo estas médias diferentes pela análise de variância ( $P=0,0314$ ) (Tabela 5 e Apêndice 9).

A medição do comprimento das brotações e a contagem do número de folhas é mostrado na tabela 5. Verificou-se que as brotações formadas eram curtas, em média de 0,23 cm de comprimento, sendo que o tratamento 1 (MS) apresentou um comprimento das brotações de 0,35 cm e o tratamento 2 (WPM) um comprimento de 0,12 cm. Apesar das brotações desenvolvidas no meio MS apresentarem um comprimento três vezes maior do que as desenvolvidas no meio WPM, não foi observada diferença significativa entre os mesmos ( $P=0,4108$ ) (Apêndice 9).

Nicoloso et al. (2001), cultivando *in vitro* segmentos nodais de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen), em meio de cultura MS suplementado com variações de macronutrientes, obtiveram em média aos 30 dias, brotações de 0,93 cm de comprimento.

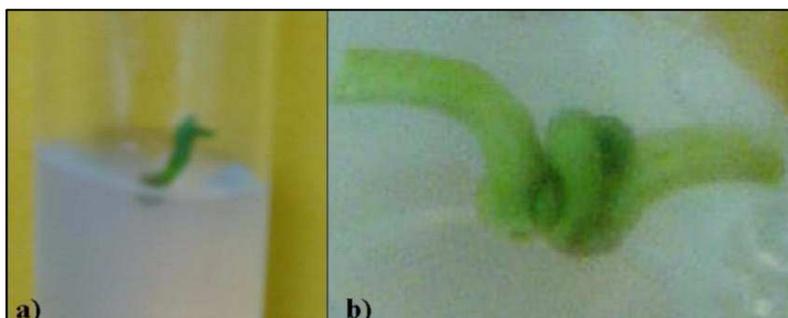
As brotações de ginkgo obtidas neste experimento eram simples, com poucas folhas, sendo que as mesmas apresentavam-se pouco expandidas (Figura 12a-b). Os ápices cultivados no meio MS

produziram maior número de folhas (1,50) comparado com os desenvolvidos no meio WPM (0,58), sendo esta diferença significativa pela análise de variância ( $P=0,0197$ ) (Tabela 5 e Apêndice 9).

**Tabela 5.** Freqüência de brotação, comprimento médio das brotações e número médio de folhas em ápices caulinares de *Ginkgo biloba* nos meios de cultura MS e WPM aos 30 dias de cultivo. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2005

Tratamentos	Meio básico	Dias de cultivo		
		30		
		Freqüência de brotação (%)	Comprimento médio das brotações (cm)	Número médio de folhas/ápice caulinar
1	MS	33,3 a	0,35 <sup>ns</sup>	1,50 a
2	WPM	8,3 b	0,12	0,58 b
Média		20,8	0,23	1,04
C.V. %		38,72	271,42	79,04

Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pela ANOVA.



**Figura 12.** Ápices caulinares de *Ginkgo biloba* desenvolvidos aos 30 dias de cultivo no meio MS. a) Início da formação de brotação; b) brotação mostrando o início da expansão de duas folhas. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2005.

Ao contrário, o meio WPM foi superior ao MS no cultivo de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.), pois esse meio permitiu um maior número de brotação classificadas como grandes. Brotações grandes obtidas no meio WPM apresentaram percentual de 70,8 %, enquanto que no meio MS 49,8 % (MELO et al., 1999).

Modificações e diluições do meio MS têm sido utilizadas no estabelecimento do cultivo *in vitro* de várias espécies. Entretanto, para algumas espécies lenhosas, esse meio não se mostrou adequado, observando-se que composições mais diluídas em macronutrientes como do meio WPM tiveram melhor desempenho, servindo como alternativa ao meio MS (MELO et al., 1999). O meio WPM foi desenvolvido por Lloyd e McCown (1980), especialmente para o cultivo de espécies lenhosas que não respondem bem em meios com alta concentrações de sais como o MS.

O meio MS apresenta maior concentração de macronutrientes que o meio WPM (tabela 2 do material e métodos), apresentando-se quatro vezes mais concentrado que o WPM. As concentrações de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  também são bastante variáveis entre estes dois meios, sendo que o meio MS apresenta maior concentração de  $\text{NH}_4^+$  (1,94 mM) quando comparado com o meio WPM (MELO et al., 1999).

Caldas et al. (1990), discutem a influência da utilização da forma inorgânica do nitrogênio sobre o crescimento e desenvolvimento de tecidos cultivados *in vitro*, destacando que o nitrato é a melhor forma para algumas culturas. Por outro lado, a utilização de nitrogênio somente na forma amoniacal causa sintomas de toxidez nas células e tecidos vegetais. Portanto, é recomendada a

utilização de uma combinação das duas formas de nitrogênio no cultivo *in vitro* (Sargent & King, 1974 *apud* MELO et al., 1999).

Uma outra diferença entre os meios é que o WPM apresenta uma concentração de  $\text{SO}_4^-$  cerca de quatro vezes menor do que no meio MS. Ressalta-se que, apesar de ser absorvido ativamente, o enxofre na forma de sulfato é um dos principais componentes do meio de cultura, influenciando no metabolismo das células vegetais (Mengel & Kirkby, 1987 *apud* MELO et al., 1999).

Aos 60 dias de cultivo, realizou-se o subcultivo dos ápices caulinares, quando verificou-se que o número de folhas e o comprimento das brotações apresentavam os mesmos valores da avaliação anterior efetuada aos 30 dias de cultivo (Tabela 6). No entanto, foi possível observar a presença de gemas adventícias em alguns explantes de ambos tratamentos.

Na Tabela 6, observa-se que em média, os ápices caulinares apresentaram a indução de 1,37 gemas/ápice, com uma variação de 1,66 gemas no tratamento 1 (MS) e 1,08 gemas no tratamento 2 (WPM), sendo estes valores não diferentes pela análise de variância ( $P=0,0674$ ) (Tabela 6 e Apêndice 10).

**Tabela 6.** Comprimento médio das brotações, número médio de folhas e gemas em ápices caulinares de *Ginkgo biloba* nos meios de cultura MS e WPM aos 60 dias de cultivo. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2005

Tratamentos	Meio básico	Dias de cultivo		
		60		
		Comprimento médio das brotações (cm)	Número médio de folhas/ápice caulinar	Número médio de gemas/ápice caulinar
1	MS	0,35 <sup>ns</sup>	1,50 a	1,66 a
2	WPM	0,12	0,58 b	1,08 b
<b>Média</b>		0,23	1,04	1,37
<b>C. V. %</b>		271,42	79,04	51,23

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pela ANOVA.

Da mesma forma Erig e Schuch (2004), observaram que através do cultivo *in vitro* de ápices caulinares de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) nos meios de cultura MS e WPM, suplementado com quatro variações na concentração de seus sais, foi possível verificar uma formação média de 3,52 gemas e 3,12 gemas, respectivamente. Em espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), Franco et al. (1998), observaram a indução de gemas axilares em segmentos nodais cultivados nos meio MS e WPM, suplementados com 0,1 e 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Em *Ginkgo biloba*, o desenvolvimento direto de brotações a partir de ápices meristemáticos tem sido relatado por poucos pesquisadores e existem contradições quanto aos tratamentos utilizados.

Hao et al. (2000), estudaram o efeito de vários fatores de crescimento, entre eles fitorreguladores (zeatina e ANA) e aditivos

nutricionais (caseína hidrolizada e adenina), no cultivo *in vitro* de segmentos caulinares de *Ginkgo biloba*. O uso de reguladores de crescimento promoveu o desenvolvimento de calos e inibiram o desenvolvimento dos ápices com brotação (como observado no experimento I deste estudo). Já o meio MS sem reguladores de crescimento, suplementado com caseína hidrolizada na concentração de 500 mg L<sup>-1</sup> foi o melhor meio para o desenvolvimento de gemas e formação de brotações. Neste meio, 89,3 % das gemas brotaram, sendo estas posteriormente enraizadas em meio MS + 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. A taxa de enraizamento foi de 33,3 %.

Em contraste, HUH et al. (2002) determinaram que a combinação 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP +0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA+ 0,5 % carvão ativado, foi a melhor combinação para o desenvolvimento de gemas de segmento de caule, sendo que aos 19 dias de cultivo 68 % dos segmentos apresentaram brotações. Na ausência de carvão ativado, esta frequência foi reduzida para 20 %. Portanto, os relatos na literatura, demonstram a importância dos suplementos nutricionais no desenvolvimento de gemas e brotações a partir de ápices caulinares de ginkgo. Este procedimento deve ser empregado em futuros experimentos desenvolvidos com esta espécie.

Montes-López e Rodrigues-de la O (2001), relataram que a produção de brotações a partir de gemas apicais e axilares de ginkgo foi de 25 % no controle (MS sem reguladores de crescimento), sendo esta frequência substancialmente elevada quando altas concentrações da citocinina BAP foi empregada. O uso de 15 e 20 mg L<sup>-1</sup> de BAP produziu 60 % e 80 % de brotações, respectivamente.

No presente experimento, observou-se que, ao longo do tempo, as folhas obtidas nas brotações de ginkgo começaram a cair, os meristemas cessaram seu desenvolvimento e necrosaram, não sendo possível a regeneração de plantas. Durante este processo, algumas folhas também apresentaram vitrificação. De acordo com Guerra (2003), a vitrificação consiste numa desordem fisiológica que afeta os brotos formados *in vitro*. As folhas apresentam-se grossas, pequenas, enrugadas e quebradiças.

Perda das brotações iniciais por necrose, também foi um problema enfrentado em experimentos anteriores realizado com o meio WPM na ausência de reguladores de crescimento (experimento I, capítulo I). Assim, os resultados obtidos neste experimento, demonstram que ambos os meios básicos WPM e MS sem suplementação de reguladores de crescimento não mantiveram a sobrevivência dos ápices caulinares de *Ginkgo biloba*. Uma das alternativas para contornar este problema seria a adição de suplementos nutricionais como a caseína hidrolisada (500 mg L<sup>-1</sup>) utilizada com sucesso por Hao et al. (2000) nesta espécie e a adição de carvão ativado (0,5 %), que induziu um aumento em 3 vezes a taxa de brotações obtidas a partir de segmentos caulinares de ginkgo cultivados *in vitro* (HUH et al., 2002).

A importância de aditivos nutricionais no desenvolvimento de ápices de ginkgo também foi bastante enfatizada por Tommasi e Scaramuzzi (2004), que só obtiveram brotações na presença de extrato de endosperma de ginkgo. Na ausência deste, nenhuma brotação se desenvolveu. Cabe ainda salientar, que plantas regeneradas *in vitro* e aclimatizadas, provenientes de cultivo de ápices

caulinares, foram somente relatadas por Hao et al. (2000) e Chu et al. (1987), demonstrando que esta espécie realmente apresenta dificuldades de propagação *in vitro*.

#### **4 CONCLUSÕES**

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos, pode-se concluir que:

1. Foi possível induzir calogênese em *Ginkgo biloba* a partir do cultivo de ápices caulinares na presença de diferentes citocininas combinadas com auxinas;

2. A frequência de calos organogênicos e o número de gemas por calo observados aos 30 dias de cultivo foi influenciada pela combinação de reguladores de crescimento;

3. Combinações de reguladores que promoveram maior número de calos organogênicos aos 30 dias de cultivo, não foram as mesmas apontadas como mais eficientes para a sobrevivência dos mesmos observados aos 60 dias;

4. A suplementação com aditivos nutricionais foi eficiente na sobrevivência dos calos organogênicos aos 60 dias, quando se utilizou a combinação hormonal (CIN+AIA), sendo que a adição de caseína hidrolisada induziu maior produção de calos organogênicos;

5. O meio de cultura básico, sem reguladores de crescimento, induz o desenvolvimento dos ápices caulinares e das brotações sem passar pela fase de calo.

6. A composição de sais nos meios básicos influenciou a frequência de brotações e o número de folhas obtidas de ápices caulinares de ginkgo, sendo o meio MS superior ao meio WPM;

7. A necrose dos meristemas e calos induzidos é um problema a ser superado para o estabelecimento de um protocolo de micropropagação.

## CAPÍTULO III

### PROPAGAÇÃO DA *Ginkgo biloba* L. POR ENRAIZAMENTO DE ESTACAS SEMILENHOSAS E USO DO AIB

Paloma Alves da Silva Sexto<sup>1</sup>; Alexandre Augusto Nienow<sup>2</sup>; Delvino Nolla<sup>3</sup>; Magali Ferrari Grando<sup>4</sup>

**RESUMO** - O trabalho foi desenvolvido na FAMV/UPF, em Passo Fundo-RS, com o objetivo de avaliar o potencial de enraizamento de estacas semilenhosas de *Ginkgo biloba* L. Foram utilizadas estacas apicais e basais de 10 cm de comprimento, coletadas em abril de 2004, tratadas com ácido indolbutírico (AIB) nas doses de 4500 e 9000 mg L<sup>-1</sup> por imersão rápida (10 segundos), comparadas com a testemunha (sem AIB). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, arranjado no esquema fatorial 2 x 3, com quatro repetições e 10 estacas por parcela. A estaquia foi realizada em bandejas de isopor de 72 células, com substrato de casca de arroz carbonizada. As estacas foram mantidas durante 180 dias em estufa dotada de sistema de nebulização intermitente. O enraizamento obtido

---

<sup>1</sup> Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>., Mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

<sup>2</sup> Co-orientador, Eng. Agr., Dr., professor de Fruticultura e Silvicultura da FAMV/UPF.

<sup>3</sup> Eng. Agr., M.Sc., professor de Plantas Medicinais da FAMV/UPF.

<sup>4</sup> Orientadora, Bióloga, Ph.D., professora de Genética, Biotecnologia e Biologia Molecular da FAMV-ICB/UPF.

foi muito baixo (2,5 % a 12,5 %). A aplicação de AIB não aumentou o enraizamento.

**Palavras-chave:** Estaquia, Ácido indolbutírico, Produção de mudas.

**THE PROPAGATION OF *Ginkgo biloba* L. BY ROOTING OF SEMI HARDWOOD CUTTINGS AND THE USE OF AIB**

**Paloma Alves da Silva Sexto<sup>1</sup>; Magali Ferrari Grando<sup>2</sup>; Alexandre Augusto Nienow<sup>3</sup>; Delvino Nolla<sup>4</sup>**

**ABSTRACT** - The work was carried out in FAMV/UPF, in Passo Fundo-RS, with the aim of evaluate the potential rooting of semi hardwood cuttings of *Ginkgo biloba* L. It was used apical and basal cuttings with 10 cm of length, collected in April 2004, treated with indolbutyric acid (AIB) in the doses of 4500 and 9000 mg L<sup>-1</sup> by fast immersion (10 seconds), compared with the witnessed (without AIB). The experimental delineation was entirely randomized, arrange in a factorial scheme 2x3, with four replications and ten cuttings by precision. The cutting was made in styrofoam trays of 72 cells, with substrates of carbonized rice hulls. The cuttings were measured during 180 days in greenhouse with an intermittent nebulization system. The

---

<sup>1</sup> Agronomist, Master student in Agronomy Graduation Program, Major in Plant Production at Department of Agronomy and Veterinarian Medicine – University of Passo Fundo (FAMV/UPF).

<sup>2</sup> Co-adviser, Agronomist, Dr., professor of Fruit and Silviculture, FAMV/UPF.

<sup>3</sup> Agronomist, M.Sc., professor of Herbal plants of FAMV/UPF.

<sup>4</sup> Adviser, Biologist, Ph.D., professor of Genetics, Biotechnology and Molecular Biology, FAMV/UPF, ICB/UPF.

rooting obtain was very low (2,5 % to 12,5 %). The application of AIB did not enhance the rooting.

**Key words:** Cuttings, Indolbutyric acid, Seedling production.

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero Ginkgo, hoje largamente cultivado e representado pela espécie chinesa *Ginkgo biloba* L., tem sua origem no período jurássico, aproximadamente há 190 milhões de anos (TREDICI, 1992).

A ginkgo é classificada como planta medicinal por possuir substâncias que têm ação farmacológica, visto que o extrato da folha possui substâncias não encontradas em outras plantas, como os ginkgolides A, B e C, que juntos formam um composto fitoterápico essencial para o tratamento da circulação cerebral, melhorando a concentração e a memória (LORENZI & MATOS, 2002). De acordo com Tredici (1991), os ginkgolides são trilactonas terpênicas, amplamente utilizados como antagonistas do fator ativador plaquetário do sistema sangüíneo, o que tornou a espécie comercialmente importante, em função da extração de tais compostos das folhas.

De acordo com Hill (1985), a maneira mais comum de multiplicação da ginkgo é através de sementes, mas as estacas são preferidas, pois enraízam muito bem, necessitando de cuidados especiais como irrigação e fertilização adequadas. Por sua vez Stumpf (1987), cita que a espécie possui dificuldades de enraizamento por estacas e dormência das sementes fora do seu habitat original, o que inviabiliza a multiplicação por sementes.

Montes-López e Rodríguez-de la O (2001), relatam que a ginkgo é uma espécie muito difícil de propagar por métodos

vegetativos, e que até então nenhum resultado relevante havia sido obtido usando métodos que promovam o enraizamento de estacas.

A propagação assexuada por estaquia, na qual é induzido o enraizamento adventício de segmentos retirados da planta matriz, possui como vantagens a obtenção de muitas mudas a partir de uma única planta, o baixo custo e a fácil execução, porém os resultados obtidos são variáveis em função da cultivar, do substrato e do ambiente (FACHINELLO et al., 1995).

A rizogênese depende da interação entre fatores endógenos (fitohormônios, cofatores e nutrientes) e fatores exógenos (luz, temperatura e umidade) (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990). A auxina possui ação desencadeante da rizogênese, sendo considerada indispensável ao processo de enraizamento de plantas lenhosas (MARGARA, 1988).

Dentre as substâncias reguladoras de crescimento, as auxinas exógenas têm participação fundamental no processo de rizogênese, principalmente nas espécies lenhosas que possuem dificuldades para enraizar (Gaspar & Hofinger, 1988 *apud* LOPES et al., 2001). O AIB (ácido indolbutírico) tem sido utilizado com muita frequência no enraizamento de *Eucalyptus* e outras espécies lenhosas (BURGER, 1987).

Assim como o uso de reguladores de crescimento torna-se indispensável para favorecer a indução de raízes, a realização de lesões na base das estacas também permite o aumento da taxa respiratória e, conseqüentemente, os teores de auxina, carboidratos e etileno na área lesionada, podendo induzir a emissão de raízes, principalmente em estacas lenhosas (FACHINELLO et al., 1995).

O substrato é um dos fatores que também merece devida atenção, pois se for adequado proporciona retenção de água suficiente para prevenir a dessecação da base da estaca. Quando saturado, deve manter uma porosidade que facilite a distribuição de oxigênio. No caso da casca de arroz carbonizada (CAC), as vantagens são a fácil obtenção e o baixo custo. A desvantagem pode ser a presença de sais que prejudicam certas estacas (FACHINELLO et al., 1995).

No caso da *Ginkgo biloba*, poucos estudos são relatados sobre a utilização da técnica de propagação por estaquia, com intuito de se estabelecer protocolos eficientes de multiplicação.

Chu et al. (1987), relatam a indução de enraizamento em miniestacas de ginkgo, com 7 cm de comprimento, quando submetidas ao tratamento de AIB na concentração de 3000 mg L<sup>-1</sup>. Shepperd (2003), utilizando estacas de ginkgo de 10 a 15 cm de comprimento, obteve o enraizamento das mesmas com a utilização de 8000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, aplicado na forma de talco. Já Mello et al. (2003), verificaram que nas concentrações de AIB utilizadas (0; 1000; 2000 e 3000 mg L<sup>-1</sup>), em dois tipos de estacas lenhosas de ginkgo (apicais e basais), não houve enraizamento.

Diante das dificuldades e variações nos resultados até então obtidos, o presente estudo teve como objetivo avaliar a propagação vegetativa por estaquia da *Ginkgo biloba*, utilizando diferentes concentrações do ácido indolbutírico (AIB), em estacas semilenhosas apicais e basais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, RS, em uma estufa de 210 m<sup>2</sup> (Figura 1), 2,5 metros de altura (pé direito), instalada no sentido norte/sul, revestida de polietileno de baixa densidade (PEBD), com cortinas laterais móveis. Internamente, para reduzir a temperatura e a radiação, foi instalada a uma altura de 2,5 m e também nas laterais, uma tela preta de sombreamento (75 %).



**Figura 1.** Estufa dotada de sistema de irrigação por nebulização, utilizada na pesquisa. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

O sistema de irrigação intermitente consta de linhas de nebulização espaçadas 1,5 metros entre si, com bicos nebulizadores a cada 1 metro. O intervalo entre os momentos de molhamento foi regulado por um *timer* automático, variando entre 7 e 10 segundos a

cada 10 minutos, ajustado conforme a oscilação das condições meteorológicas, com os objetivos de manter uma fina camada de água na superfície das estacas e das folhas, elevar a umidade relativa do ar e baixar a temperatura do ar e das estacas, reduzindo a transpiração.

As estacas foram coletadas de uma árvore adulta de *Ginkgo biloba* com aproximadamente 12 anos e 8 m de altura, pertencente ao viveiro comercial Rosiflor, situado no município de Ijuí, RS (Figura 2).



**Figura 2.** Árvore matriz de *Ginkgo biloba* localizada no viveiro comercial Rosiflor, em Ijuí-RS, 2004.

Foram coletadas da planta matriz, em 20/04/04, estacas semilenhosas com 0,7 a 1,0 cm de diâmetro. Após a coleta, foram molhadas e envolvidas em papel jornal umedecido, acondicionadas

em sacos de polietileno e em caixa de isopor para o transporte, evitando a transpiração excessiva.

No laboratório o comprimento das estacas foi padronizado para 30 cm e, posteriormente, seccionadas em três estacas de aproximadamente o mesmo tamanho (Figura 3), passando a serem consideradas do tipo apical, subapical e basal. As subapicais foram utilizadas para teste e as demais no experimento.



**Figura 3.** Estacas de *Ginkgo biloba* coletadas da planta matriz. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

Os tratamentos consistiram na avaliação da capacidade de enraizamento de estacas apicais e basais, tratadas com ácido indolbutírico (AIB) em três concentrações (0; 4500 e 9000 mg L<sup>-1</sup>).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com os tratamentos arranjados no esquema fatorial 2 x 3 (dois tipos de estacas e três concentrações de AIB), com quatro repetições. Cada repetição constou de 10 estacas, perfazendo o total de 240 estacas (120 apicais e 120 basais).

No preparo das soluções de AIB, o produto puro, da marca Sigma, foi dissolvido inicialmente em 50 mL de álcool etílico a 98° GL, sendo o volume de 100 mL completado com água destilada.

A desinfestação das estacas foi realizada mediante imersão do material durante 5 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1 % (produto comercial Mazarolo) e, posteriormente, lavadas em água corrente.

Após a assepsia, duas lesões longitudinais foram realizadas com canivete, em lados opostos da base das estacas, com 3 cm de extensão, de modo a romper a casca e expor a região cambial para estimular o enraizamento.

O tratamento com regulador de crescimento consistiu na imersão da base da estaca (3 cm) durante 10 segundos (imersão rápida) na solução de AIB, e estaquia imediata em bandejas de isopor de 72 células, utilizando como substrato a casca de arroz carbonizada, com o enterrio da base a 6 cm de profundidade (Figura 4). Concluída a estaquia, as bandejas foram regadas manualmente, para acomodar o substrato e fixar as estacas, e colocadas na estufa de nebulização (Figura 5).

O acompanhamento do momento de início do enraizamento foi realizado a partir das estacas testes subapicais, de quinze em quinze dias. Com o auxílio de uma faca de ponta, e

pressionando levemente as estacas para cima, eram retiradas três estacas por tratamento. Após a observação da presença ou não de raízes eram recolocadas no substrato e, na avaliação seguinte, outras três estacas eram analisadas.



**Figura 4.** Estacas de *Ginkgo biloba* em bandejas de isopor contendo como substrato casca de arroz carbonizada. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.



**Figura 5.** Vista parcial do experimento em estufa de nebulização com o sistema ativado. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

A estaquia foi realizada em 22/04/2004. Após 180 dias de permanência das estacas no leito de enraizamento (20/10/04), foram coletados os seguintes dados: porcentagem de estacas vivas, de estacas vivas enraizadas e de estacas vivas não enraizadas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo pacote estatístico Estat.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As brotações iniciaram 90 dias após a estaquia, com variação do número de brotos por estacas (Figura 6), sem destaque para um determinado tratamento. Lopes et al. (2001), também não observaram diferenças na porcentagem de estacas brotadas de Mogno

(*Swietenia macrophylla* King), testadas as concentrações de 0, 1500, 3000, 4500 e 5000 mg L<sup>-1</sup> de AIB.



**Figura 6.** Brotação das estacas apicais de *Ginkgo biloba*. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

A demora para o início da brotação pode ser justificada, provavelmente, pelo fato da espécie ser caducifólia e permanecer em dormência durante o período de baixas temperaturas. Para romper a dormência, requer certa quantidade de frio e, ao término, de calor, condições que podem ter sido cumpridas apenas na segunda quinzena de julho.

Após o início do fluxo de brotação, a taxa de mortalidade das estacas foi sendo elevada, restando ao término do experimento, 180 dias após a estaquia, porcentagens de sobrevivência que variaram de 15 % a 27,5 % (Figuras 7 e 8), sem diferir entre os tratamentos (Tabela 1 e Apêndice 10).

**Tabela 1.** Porcentagem de estacas apicais e basais vivas brotadas de *Ginkgo biloba*, com e sem tratamento de AIB aos 180 dias após a estaquia. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004

Doses de AIB (mg L <sup>-1</sup> )	Estacas vivas brotadas (%)		
	Tipo de estaca		Média
	Apical	Basal	
<b>0</b>	15,0	15,0	15,0 <sup>NS</sup>
<b>4500</b>	10,0	25,0	17,5
<b>9000</b>	20,0	35,0	27,5
<b>Média</b>	15,0 <sup>NS</sup>	25,0	
<b>C.V. (%)</b>		45,10	

,NS/ns - não significativo em nível de 5% pela Anova.

A baixa porcentagem de sobrevivência pode ser atribuída ao longo tempo que as estacas permaneceram no leito, sem formação de raízes, somada a brotação, que provavelmente drenou parcela significativa das reservas das estacas, levando à morte das mesmas.



**Figura 7.** Brotação das estacas basais de *Ginkgo biloba*. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.



**Figura 8.** Estacas apicais e basais mortas de *Ginkgo biloba*. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

Trevisan et al. (2000) observaram em pessegueiro, que a mortalidade das estacas pode estar relacionada ao potencial genético de cada cultivar. Nachtigal et al. (1994), também com pessegueiro, relatam que a mortalidade de estacas está relacionada com o grau de lignificação dos tecidos, ou seja, quanto mais herbáceo maior a possibilidade de desidratação. E ainda a morte de estacas após a formação das raízes é, provavelmente, consequência da manutenção das mesmas na nebulização por um período maior do que o necessário ao enraizamento, causando a morte das raízes por excesso de umidade.

No trabalho foram utilizadas estacas semilenhosas, que no decorrer do processo de estaquia se tornaram mais lenhosas. Portanto, a possibilidade de morte por desidratação da parte aérea pode, a princípio ser descartada, considerando o não enraizamento e à redução das reservas das estacas, e também a utilização do sistema de nebulização intermitente.

A porcentagem de estacas enraizadas (Tabela 2 e Apêndice 10) foi muito baixa, menor que a de estacas vivas, não diferindo os tratamentos entre si. Foi observado enraizamento somente dentre as estacas que permaneceram vivas.

No tratamento sem AIB enraizaram cinco estacas apicais e uma basal, e na dose de 4500 mg L<sup>-1</sup> de AIB três estacas basais, totalizando nove estacas em todo o experimento (Figura 9). Nenhuma estaca enraizou com a maior dose de AIB.

**Tabela 2.** Porcentagem de estacas apicais e basais vivas enraizadas de *Ginkgo biloba*, com e sem tratamento de AIB aos 180 dias após a estaquia. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004

Doses de AIB (mg L <sup>-1</sup> )	Estacas vivas enraizadas (%)		Média
	Tipo de estaca		
	Apical	Basal	
<b>0</b>	12,5	2,5	7,5 <sup>NS</sup>
<b>4500</b>	0,0	7,5	3,8
<b>9000</b>	0,0	0,0	0,0
<b>Média</b>	4,2 <sup>NS</sup>	3,3	
<b>C.V. (%)</b>		268,51	

NS/ns - não significativo em nível de 5% pela Anova.



**Figura 9.** Enraizamento de estacas de *Ginkgo biloba* sem AIB. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004.

Das cinco estacas apicais que enraizaram, uma apresentou 1 raiz (12,5 cm de comprimento), uma com 2 raízes (comprimento médio de 1,8 cm e da maior raiz de 2,0 cm), uma com 3 raízes (comprimento médio de 2,8 cm e da maior raiz de 4,9 cm), e duas com 4 raízes (comprimento médio de 1,5 cm e 0,9 cm, e da maior raiz de

2,0 cm e 1,1 cm, respectivamente). A estaca basal que enraizou sem AIB apresentava 4 raízes, com comprimento médio de 0,8 cm e da maior raiz de 1,1 cm. Na dose de 4500 mg L<sup>-1</sup> de AIB, das três estacas basais enraizadas duas apresentaram 4 raízes (comprimento médio de 2,5 cm e 4,6 cm, e da maior raiz de 4,5 cm e 14,0 cm, respectivamente) e uma com 1 raiz (comprimento de 12 cm).

As dificuldades de enraizamento foram também verificadas por Mello et al. (2003), que obtiveram um percentual de apenas 21,2 % em estacas apicais e basais lenhosas de *Ginkgo biloba*, nas doses de 0, 1000, 2000 e 3000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, não diferindo os tratamentos.

Já Chu et al. (1987), obtiveram o enraizamento de 60 % das estacas de ginkgo tratadas com a dose de 3000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, após seis semanas de estaquia. Entre sete e oito semanas após a estaquia, Shepperd et al. (2003), alcançaram o enraizamento de 46 % das estacas de ginkgo na dose de 8000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, aplicado na forma de talco.

As razões que podem justificar o baixo enraizamento são várias e provavelmente em interação. Dentre os fatores podemos citar os de ordem endógena, ou seja, relacionados à planta matriz ou às estacas, como a idade da planta matriz, o tipo de estaca, que também está vinculado à época do ano em que foi coletada e, especialmente, à genética e o balanço hormonal da espécie e/ou exemplar utilizado, conforme também apontam Fachinello et al. (1995).

Dutra et al. (1999) afirmam que, com o aumento da idade da planta, ocorre a redução das taxas de divisão celular e capacidade de regeneração, o que resulta em baixo enraizamento, e recomendam o

uso de brotações jovens de plantas adultas. Toffanelli et al. (2002) relatam que o tipo de estaca e a época de coleta são fatores críticos na determinação do percentual de enraizamento, pois a capacidade de formar raízes é determinada pelo anel de esclerênquima e o aumento de substâncias inibidoras durante a dormência.

A porcentagem de estacas vivas não enraizadas foi superior às enraizadas, não diferindo os tratamentos entre si (Tabela 3 e Apêndice 10). É difícil afirmar se todas as estacas vivas enraizariam caso o experimento tivesse continuidade. De qualquer forma, numa visão comercial de produção de mudas, um período para enraizamento superior a 180 dias (6 meses) poderia não ser economicamente viável para um viveirista, apesar do alto valor da muda no mercado. Tornasse, assim, necessário que as pesquisas tenham prosseguimento, de forma a aumentar a taxa de enraizamento e reduzir o tempo para tal.

**Tabela 3.** Porcentagem de estacas apicais e basais vivas não enraizadas de *Ginkgo biloba*, com e sem tratamento de AIB aos 180 dias após a estaquia. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004

Doses de AIB (mg L <sup>-1</sup> )	Estacas vivas não enraizadas (%)		
	Tipo de estaca		Média
	Apical	Basal	
<b>0</b>	2,5	12,5	7,5 <sup>ns</sup>
<b>4500</b>	10,0	17,5	13,8
<b>9000</b>	20,0	35,0	27,5
<b>Média</b>	10,8 <sup>NS</sup>	21,7	
<b>C.V. (%)</b>		58,39	

NS/ns - não significativo em nível de 5% pela Anova.

#### 4 CONCLUSÕES

Nas condições em que o experimento foi conduzido, podemos concluir que:

1. Estacas semilenhosas de *Ginkgo biloba* L., coletadas em abril, apresentam baixo enraizamento (2,5 % a 12,5 %).
2. O ácido indolbutírico (AIB), nas doses e tempo de aplicação testados, não aumenta o enraizamento.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento *in vitro* e estaquia de *Ginkgo biloba* com a finalidade de futuramente desenvolver protocolos de propagação vegetativa. No cultivo *in vitro*, foram avaliados tipos de explantes, meios de cultura (sais e reguladores de crescimento), bem como aditivos nutricionais e diferentes formas de desinfestação fitossanitária, no estabelecimento da cultura e na resposta morfogenética. Houve o desenvolvimento dos meristemas em meio de cultura na ausência de reguladores de crescimento. A calogênese em *Ginkgo biloba* foi observada quando foi utilizado citocinina combinado ou não com auxina.

Devido à indisponibilidade das sementes de ginkgo, o que impede a utilização de embriões e tecidos de plântulas germinadas *in vitro* como explantes, e também a dificuldade da utilização de extrato de endosperma como suplemento nutritivo, os esforços para desenvolver metodologias de cultivo *in vitro* em ginkgo deve ser focalizado em explantes obtidos de plantas jovens ou árvores adultas existentes na região e utilização de aditivos nutricionais alternativos.

No presente estudo, o problema que impediu o estabelecimento de um protocolo de regeneração de plantas foi a necrose dos tecidos cultivados ao longo dos subcultivos. Para resolver este problema, poder-se-ia realizar estudos adicionais sobre o efeito de diferentes fatores químicos e físicos no desenvolvimento e manutenção dos ápices caulinares e calos obtidos *in vitro*. Para tal, diferentes composições de meios de cultura contendo maiores

concentrações de caseína hidrolisada e uso de outros suplementos nutricionais como água e/ou leite de coco e carvão ativado, também podem ser testados. Ainda, alta concentração de citocinina (BAP ou cinetina) e utilização de meio de multiplicação com baixa concentração de BAP combinado com giberelina (GA<sub>3</sub>), podem auxiliar o desenvolvimento de protocolos de regeneração de plantas. Alternativamente, sugere-se optar por induzir outra resposta morfogênética, como a embriogênese somática pela utilização de 2,4-D e outros tipos de explantes, como discos foliares.

Para controlar o processo de necrose, a adição de carvão ativado e antibióticos no meio de cultura, bem como a influência de luz/escuro devem ser investigados.

Uma das limitações na realização deste trabalho foi o reduzido número de explantes e matrizes disponíveis. A aquisição de 22 novas matrizes pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV/UPF pode, em parte, solucionar estes problemas.

Outro importante fator limitante, nesta espécie, é que, os experimentos somente podem ser estabelecidos numa determinada época do ano, ou seja, na primavera/início do verão, quando a planta sai do processo de dormência. Este fato dificulta a realização de maior número de experimentos, ou mesmo a repetição de experimentos para comprovação dos resultados.

Partindo dos resultados obtidos no trabalho com estaquia, recomenda-se que, em trabalhos futuros, sejam realizados testes com diferentes épocas do ano de coleta e plantio de estacas, doses menores e maiores do regulador de crescimento AIB, diversos substratos, nebulização com menor frequência e redução do tempo de

permanência das estacas no leito de enraizamento, o que provavelmente reduziria a mortalidade das estacas enraizadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. F.; PEDROTTI, E. L. Micropropagação de macieira. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 31, p. 100-108, 2003.

AITCHISON, I. J. R. Relativistic three-pion dynamics generated by two-body unitarity and analyticity. *Phys. G.: Nucl. Phys.*, v. 3, p. 121, 1977.

ALVARENGA, L. R.; CARVALHO, V. D. Uso de substâncias promotoras de enraizamento de estacas frutíferas. *Informe Agropecuário*, v. 9, n. 101, p. 47-55, 1983.

ANDERSON, L. M. Culture and regeneration of *Populus* leaf protoplasts isolated from non-seedling tissue. *Plant Science*, v. 46, p. 133, 1984.

ANDRADE, M. W. de; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; DE MELO, P. R. A. *Micropropagação da aroeira (Myracrodruon urundeuva Fr. All)*. Disponível em: <[www.google.com.br/micropropagaçãolenhosas/aroeira](http://www.google.com.br/micropropagaçãolenhosas/aroeira)>. Acesso em: 14 jun. 2004.

ARAÚJO, P. S.; DA SILVA, J. M. O. D.; NECKEL, C. A. et al. Micropropagação de babosa (*Aloe vera*). *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 25, p. 21-23, 2002.

ASSIS, T. F. DE; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa– SPI/ Embrapa-CNPH, v. 1, 1998. p.261-296.

BALZ, J. P.; COURTOIS, D.; DRIEU, J. et al. Production of ginkgolides and bilobalides by *Ginkgo biloba* plants and tissue culture. *Planta Medica*, v. 65, p. 620-626, 1999.

BANOV, D. R.; PAULA, V. R. P.; RIBEIRO, M. E. *Ginkgo biloba* na fitocosmética. *Cosmetics & toiletries*. v. 11, p. 44-48, 1999.

BELL, J.; REED, M. Disponível em:<  
[www.virginia.edu/registrar/records/01ugradrec/chapter14/uchap14-2.1.html](http://www.virginia.edu/registrar/records/01ugradrec/chapter14/uchap14-2.1.html)>. Acesso em: 14 abr. 2004.

BRITO, A. E. R. M.; DA COSTA, M. S.; HANDRO, W. Morphogenesis and plant regeneration in leaf explants and callus tissues of *Capraria biflora* cultured *in vitro*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 7, n. 2, p. 171-174, 1995.

BURGER, D. W. *In vitro* micropropagation of *Eucalyptus sederaxylon*. *Hortscience*, v. 22, n. 3, p. 496-497, 1987.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ACTP-Embrapa/CNPH, 1990, p. 99-170.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa – SPI/ Embrapa-CNPH, v. 1, 1998. p. 87-116

CAMPER, N. D.; COKER, P. S.; WEDGE, D. E.; KEESE, R. J. *In vitro* culture of Ginkgo. *In vitro Cell. Development Biology*, v. 33, p. 125-127, 1997.

CARRIER, D. J.; COSENTINO, G.; NEUFELD, R. Nutritional and hormonal requirements of *Ginkgo biloba* embryo-derived callus and suspension cell culture. *Plant Cell Reports*, v. 8, p. 635-638, 1991.

CARRY, A.; UTTAMCHANDANI, S. J.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H. A.; HOWELL, S. H.H. Arabidopsis mutants with increased organ regeneration in tissue culture are more competent to respond to hormonal signals. *Planta*, v. 213, p. 700-707, 2001.

CARVALHO, D.; PINTO, J. E. B. P.; PASQUAL, M. Uso de fungicida e antioxidantes em cultura *in vitro* de segmentos nodais de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden. *Ciência Prática*, Lavras, v. 14, n. 1, p. 97-106, 1990.

CHANG, J. Y.; CHANG, M. N. Medicinal uses of *Ginkgo biloba*. v. 15, p. 63, 1997.

CHOI, P. S.; CHO, D. Y.; SOH, W. Y. Shoot organogenesis from immature zygotic embryo cultures of *Ginkgo biloba*. *Biologia Plantarum*, Netherlands, v. 47, n. 2, p. 309-312, 2003.

CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. *Hortscience*, United States, v. 23, p. 515-519, 1988.

CHU, M.; SKIRVIN, R.; JOUNG, H. Micropropagation of shoots of *Ginkgo biloba*. *Hortscience*, United States, n. 22, p. 93, 1987.

CIB. Centro de Informação de Biotecnologia. *Plantas Mediciniais*. Disponível em:< [www.cib.org.br](http://www.cib.org.br)>. Acesso em: 21 jun. 2005.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. *Plantas medicinais do cultivo à terapêutica*. 4. ed. Petrópolis. Editora Vozes. 1997.

DANTAS, A. C. DE M.; DUTRA, L. F.; KERSTEN, E. *Influência do ácido indolbutírico e ethefon no enraizamento de estacas herbáceas de goiabeira (Psidium guajava L.)*. Disponível em:<<http://www.ufpel.tche.br/iniciaçãoocientífica>>. Acesso em: 05 abr. 2003.

DAVIES Jr., F. T.; HARTMANN, H. T. The physiological basis of adventitious root formation. *Acta Horticulturae*, Belgic, n. 227, p. 113-120, 1988.

DOODS, J. H.; ROBERTS, L. W. *Experiments in plant tissue culture*. 3 Ed. Cambridge University Press. 1999.

DUPRÉ, P.; LACOUX, J.; NEUTELINGS, G. et al. Genetic transformation of *Ginkgo biloba* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiologia Plantarum*, England, v. 108, p. 413-419, 2000.

DUTRA, L. F.; SCHWENGBER, J. E.; TONIETTO, A.; KERSTEN, E. Enraizamento de estacas de ramos de pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 5, n. 2, p. 93-95, 1999.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de meio de cultura e sua concentração em sais na multiplicação *in vitro* de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivar MC. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12/2004, Pelotas. *Resumos...* Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2004.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. et al. *Propagação de plantas frutíferas de clima temperado*. 2. ed. Pelotas:Ufpel. 1995.

FERMINO, M. H.; BELLÉ, S. Substratos hortícolas. In: PETRY, C. (Org.) *Plantas ornamentais: aspectos para a produção*. Passo Fundo: UPF- Editora Universitária, 2000. p. 29-40.

FINARDI, N. L. Métodos de propagação e descrição de porta-enxertos. In: MEDEIROS, C. A. B.; RASEIRA, M. do C. B. (Eds.). *A cultura do pessegueiro*. Brasília: Embrapa-SPI; Pelotas: Embrapa-CPACT, 1998. p.100-129.

FLOSS, E. L. *Fisiologia das plantas cultivadas*. Passo Fundo: Editora UPF, 2004.

FRANCO, E. T. H.; MANTOVANI, N. C.; STEFANELLO, S. et al. Regeneração *in vitro* de espécies lenhosas. In: REUNIÃO ESTADUAL DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL. 9, 1996. Porto Alegre. *Resumos...* Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 101-102.

FUGH-BERMAN, A.; COTT, J. M. Dietary supplements and natural products as psychotherapeutic agents. *Psychosomatic medicine*, England, v. 61, p. 712-128, 1999.

GALLI, F.; TOKESHI, H.; CARVALHO, P. C. T. et al. *Manual de fitopatologia-doenças das plantas e seu controle*. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1968.

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: LOPES, S. C.; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R. DE L. et al. *Enraizamento in vitro de mogno*. *Cerne*, v. 7, n. 1, p. 124-128, 2001.

GbEXTRACT. *Ginkgo biloba*: reproduction. Disponível em: <<http://www.perso.wanadoo.fr/ginkgo.dm/ginkgo/gbextract.htm>>. Acesso em: 11 mar. 2005.

GOLLE, D. P.; SEXTO, P. A. DA S.; PEROTTI, J. C.; BEUTLER, H. P. Estudos preliminares para obtenção de calos em *Ginkgo biloba* L. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNISINOS. Junho, 2003, São Leopoldo. *Resumos...* São Leopoldo: Universidade do Vale do Rio dos Sinos, 2003. CD-ROOM.

GRANDO, M. F.; FRANKLIN, C. I.; SHATTERS, R. G. Optimizing embryogenic callus production and plant regeneration from 'Tifton 9' bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé) seed explant for genetic manipulation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, [S.I.], v. 17, n. 3, p. 213-222, 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 1, 1998. p.183-242.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ACTP-Embrapa/CNPq, 1990. p. 90-169.

GROLLI, P.R. Propagação de plantas ornamentais. In: PETRY, C. (Org.) *Plantas ornamentais: aspectos para a produção*. Passo Fundo: UPF- Editora Universitária, 2000. p. 41-51.

GUERRA, M. P. Vitrificação. In: *Notas de aulas de cultura in vitro*. Programa de pós-graduação em recursos genéticos vegetais da UFSC. Disponível em: <<http://www.ufsc.br/cca.ufsc.br>>. Acesso em: 13 mai. 2003.

GUERRA, M. P.; DE LUCA, P.; NIETSCHE, S.; KEMPFER, E. Biotecnologia de coníferas: indução e estabelecimento de linhagens celulares poliembriogenéticas de *Araucaria angustifolia*, *Pinus elliottii* variedade *elliottii*. In: 1º CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO, 7º CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO. Setembro, 1993. *Resumos...* SBS-SBEF.

HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ACTP-Embrapa/CNPH, 1990. p. 204-212.

HAO, G.; DU, X.; YOU, Y.; et al. *Effects of various factors on the growth and development of cultured axillary buds of Ginkgo biloba in vitro*. *Forest Research*, England, v. 13, n. 2, p. 217-221, 2000.

HARADA, H.; MURAI, Y. *Micropropagation of Prunus mume*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, United States, v. 46, p. 265-267, 1996.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. *Propagación de plantas: principios y practicas*. 4. Ed. México: Continental, 1990.

HILL, L. *Segredo da propagação de plantas*. Editora Nobel, 1985.

HINOJOSA, G. F. Auxinas. In: CID, L. P. B. *Introdução aos hormônios vegetais*. Embrapa: Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 15-53, 2000.

HOBBS, C. Ginkgo: elixir of youth. *Botanica Press*, Capitolia, California, 1991.

HUH.; YANG, J.; YANG, D.; WANG, Y. Study on stem section culture conditions *in vitro* in *Ginkgo biloba*. *Scientia Silvae Sinicae*, Japan, v. 38, n. 3, p. 52-56, 2002.

HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v. 33, n. 2, p. 105-119, 1993.

HUH, H.; STABA, E. J. The botany and chemistry of *Ginkgo biloba* L. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, England, v. 1, p. 92-124, 1992.

JENSEN, A. G.; NDKOJO, K.; WOLFENDER, J. Determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaf extracts and phytopharmaceuticals. *Phytochemical Analysis*, v. 13, p. 31, 2002.

KÄMPF, A. N. Temperatura. In:\_\_\_ (Coord.) *Produção comercial de plantas ornamentais*. Guaíba: Agropecuária. 2000. p.45-72,

KÄMPF, A. N. Temperatura. In:\_\_\_ (Coord.) *Produção comercial de plantas ornamentais*. Guaíba: Agropecuária. 2000. p.115-123.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, CBAB/Embrapa, 1999. p. 519-531.

KOROCH, A.; KAPTEYN, J.; JULIANI, H. R.; SIMON, J. E. *In vitro* regeneration and *Agrobacterium* transformation of *Echinacea purpurea* leaf explants. In: JANICK, J.; WHIPKEY, A. Trends in new crop and new uses. *ASHS Press*, Alexandria, n. 88, p. 523-526, 2000.

KYTE, L.; KLEYN, J. *Plants from test tubes: an introduction to micropropagation*. 3 ed. Timber Press, Portland, Oregon, p. 113-136, 1996.

LAINÉ, E.; DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated *Eucalyptus grandis*. In: PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; DIAS, L. L. C. et al. *In vitro* morphogenesis of *Eucalyptus grandis*: effects of antibiotics on explants. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, Netherlands, v. 5, p. 234-240, 2005.

LAURAIN, D. M.; TRÉMOUILLAUX-GUILLER, J. C.; PETERLONGO, F. Obtenção de embriões somáticos de *Ginkgo biloba* L. a partir do cultivo de embriões zigóticos imaturos. Disponível em: <<http://www.ftns.wau.nl/oc/research/phytochemistry>>. Acesso em: 18 jun. 2003.

LAURAIN, D.; CHÉNIEUX, J. C.; TRÉMOUILLAUX-GUILLER, J. Direct embryogenesis from female haploid protoplasts of *Ginkgo biloba* L., a medicinal woody species. *Plant Cell Report.*, United States, v. 12, p. 656-660, 1993b.

LAURAIN, D.; CHÉNIEUX, J. C.; TRÉMOUILLAUX-GUILLER, J. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Ginkgo biloba*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v. 44, p. 19-24, 1996.

LAURAIN, D.; TRÉMOUILLAUX-GUILLER, J.; CHÉNIEUX, J. C. Embryogenesis from microspores of *Ginkgo biloba* L., a medicinal woody species. *Plant Cell Rep.*, United States, v. 12, p. 501-505, 1993a.

LE BARS, P. L.; KATZ, M.M.; BERMAN, N. A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of *Ginkgo biloba* for dementia. *Journal of the American Medical Association*, England, v. 278, p. 1327-1332, 1997.

LICHTBLAU, D.; BERGER, J. M.; NAKANISHI, K. Efficient extraction of ginkgolides and bilobalides from *Ginkgo biloba* leaves. *Journal of Natural Products*, United States, v. 65, p. 1501-1504, 2002.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. In: COMBINED PROCEEDINGS OF INTERNATIONAL PLANT PROPAGATORS' SOCIETY. SEATTLE, v. 30, p. 421-427, 1980.

LOPES, S. C.; LAMEIRA, O. A.; FORTES, G. R. DE L. et al. *Enraizamento in vitro de mogno (Swietenia macrophylla King)*. *Cerne*, Lavras, v. 7, n. 1, p. 124-128, 2001.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. *Princípios da biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 1994.

MANTOVANI, N. C. *Estudo da regeneração in vitro de caixeta (Didymopanax morototoni (Aubl.) Dcne. et Planch.)*. 1997. 106 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Faculdade de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1997.

MARGARA, J. *Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro*. Madrid, Editora Mundi-Prensa, p. 171-197, 1988.

MARTINS, L. O.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M.; NOLLA, D. Micropropagação em *Ginkgo biloba*. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. 2001, Passo Fundo. *Resumos...* p. 236. Ed. UPF, Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2001.

McCOWN, B. H. Effects of vegetation on human response to sound. *Journal of Arboriculture*, California, v. 10, n. 2, p. 45, 1986.

McCOWN, B. H. Universality behaviors and fractal dimensions associated witer *M*-furcations. *Physiology Rev.* United States, v. 31, p. 3791, 1985.

McCOWN, B. H. *Woody Shrubs and Trees*. In: SMITH, R. H. Plant tissue culture. Techniques and Experiments. 2 Ed. Academic Press, 2000. p. 123-133.

MELLO, E. I. T.; NOLLA, D. Propagação de ginkgo biloba (*Ginkgo biloba* L.) através de estacas tratadas com AIB. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. 13, 2003, Passo Fundo. *Resumos...* Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2003. CD-ROOM.

MELLO-FARIAS, P. C.; PETERS, J. A.; NAKASU, B. H. *Micropropagação de porta-enxerto de pereira 'Old home x Farmingdale' 9*. *Revista Brasileira de Agrociência*, Botucatu, v. 2, n. 2, p. 71-78, 1996.

MELO, N. F.; OKASAKI, W. Y.; LEITE, C. B.; FÁRI, M. *Estabelecimento do cultivo in vitro da aceroleira (Malpighia emarginata DC.)*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 23, n. 1, p. 102-107, 1999.

MONTES-LÓPEZ, J. J.; RODRÍGUEZ, de La O. Establecimiento y brotación *in vitro* de yemas axilares y ápices de Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). *Revista Chapingo Série Horticultura*, Spain, n. 7, p. 49-59, 2001.

MORALES, C. F. G.; LOMBARDI, S. R. B.; SOARES, P. F.; FORTES, G. R. DE L. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cultivar gala RW1. *Revista Brasileira de Agrociência*, Botucatu, v. 5, n. 3, p. 174-177, 1999.

MROGINSKI, L. A.; BERNASCONI, N. K.; SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y. *Micropropagación de la yerba mate (Ilex paraguariensis St. Hil.): efecto del origen del explante en el establecimiento in vitro de los cultivos*. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1., REUNIÃO DO CONE-SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997. *Anais...* p. 161-169. Curitiba: Embrapa., 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, United States, v. 15, p. 473-497, 1962.

NACHTIGAL, J. C. *Obtenção de porta-enxertos "Okinawa" e de mudas de pessegueiro (Prunus persica (L.) Batsch) utilizando métodos de propagação vegetativa*. 1999. 165 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

NACHTIGAL, J. C.; HOFFMANN, A.; KLUGE, R. A. et al. *Enraizamento de estacas semilenhosas de araçazeiro (Psidium cattleianum Sabine) com uso do ácido indolbutírico*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 16, n. 1, p. 229-235, 1994.

NACHTIGAL, J. C.; PEREIRA, F. M. *Propagação do pessegueiro (Prunus persica (L.) Batsch) cv. Okinawa por meio de estacas herbáceas em câmara de nebulização em Jaboticabal-SP. Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 22, n.2, p. 208-212, 2000.

NECROSE. *Informações sobre necrose no tecido celular vegetal*. Disponível em: <<http://www.necrose.com.br>>. Acesso em: 21 jun. 2005.

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. 2, p. 11-18, 2001.

NORSTOG, K. Culture of small barley embryos on defined media. *Science*, California, v. 142, p. 1655, 1973.

NUGENT, G.; CHANDLER, S. F.; WHITEMAN, P.; STEVENSON, T. *Adventitious bud induction in Eucalyptus globulus Labill*. In: PAIVA, H. N. de; GOMES, J. M. *Propagação vegetativa de espécies florestais*. Viçosa: UFV, 1995.

OLIVEIRA, A. P. de. *Uso do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas semilenhosas e lenhosas de pessegueiro*. 2002. 96 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2002.

PAIVA, H. N. de; GOMES, J. M. *Propagação vegetativa de espécies florestais*. Viçosa: UFV, 1995. 40 p.

PANICK, B. *Multiplificación clonal de plantas elite de yerba mate mediante técnica de cultivo in vitro*. In: HÖRNER, L.; AUGUSTIN, L.; FORCELINI, C. A. et al. *Micropropagação de erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hil.)*. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 87-96, 2001.

PEREIRA, A. M. S. *Cultura de tecidos de plantas medicinais*. Disponível em: <<http://www.unaerp.br/biotecvegetal>>. Acesso em: 22 ago. 2003.

PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. Disponível em: <<http://www.biotechnologia.com.br/bio25/7.htm>>. Acesso em: 29 abr. 2003.

PERES, L. E. P.; AMAR, S.; KERBAUY, G. B. et al. Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinin ratio related to direct root tip conversion of *Catsetum fimbriatum* Lindl. into buds. *Plant Physiology*, United States, v. 155, p. 551-555, 1999.

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catsetum fimbriatum* Lindl. *Plant Cell Reports*, United States, v. 18, p. 1002-1006, 1999.

PEROTTI, J. C.; SANTARÉM, E. R. Organogênese em segmentos de entre-nós de calêndula (*Calendula officinaliss* L.). In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICRUZ. Outubro, 2002, Cruz Alta. *Resumos...* p. 55. Cruz Alta: Universidade de Cruz Alta, 2002.

PICOLI, E. A. T.; ALFENAS, A. C.; DIAS, L. L. C. et al. *In vitro* morphogenesis of *Eucalyptus grandis*: effects of antibiotics on explants. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, United States, v. 5, p. 234-240, 2005.

PIERIK, R. L. M. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa. 1990.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

SANTANA, S. C. *Propagação de camu-camu (Myrciaria dubia (H. B. K.) Mc Vaugh) por meio de estaquia*. *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, n. 29, p. 166-171, 2003.

SANTARÉM, E. R.; PEROTTI, J. C.; CARVALHO JÚNIOR, P. J. Micropropagação de hipérico (*Hypericum perforatum* L.). In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICRUZ. Outubro, 2001, Cruz Alta. *Resumos...* p. 23. Cruz Alta: Universidade de Cruz Alta, 2001.

SCHELEIDEN, M. Chapter 1. A preview of the cell. Disponível em: <[http://www.life.nthu.edu.tw/labccc/pp\\_files/cell\\_biology/chapter1.ppt](http://www.life.nthu.edu.tw/labccc/pp_files/cell_biology/chapter1.ppt)>. Acesso em: 20 nov. 2004.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. *Biotechnologia na agricultura e na agroindústria*. Guaíba: Agropecuária, 2001.

SHEPPERD, W. D. *Ginkgo biloba* L. Disponível em: <<http://www.google.com.br/regenerationginkgo/wpsm.net/ginkgo.pdf>>. Acesso em: 5 dez. 2003.

STUMPF, K. H. In: PROCEEDINGS OF' 97 INTERNATIONAL SEMINAR ON *GINKGO*, THE STATE SCIENCE AND TECHNOLOGY COMMISSION. Beijing, p. 37, 1997.

SUZIN, M. *Microrganismos e sua relação com plantas*. 2004. 68 p. Monografia (Especialização em Genética e Evolução Biológica) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3 ed. São Paulo: Artimed, 2004.

TEIXEIRA, J. B.; MARBACH, P. A. S. *Fitohormônios*. Universa. Brasília, Universidade Católica de Brasília, 2000. p. 101-132.

TESKE, M.; MARGALY, A. *Compêndio de fitoterapia*. 2ª edição. Editora Herbarium, 1995. p. 148-150.

THE GINKGO PAGES. *Ginkgo biloba*. Disponível em: <<http://www.google.com.br/theginkgopages>>. Acesso em: 24 ago. 2003.

TOFANELLI, M. B. D.; CHALFUN, N. N. J.; HOFFMANN, A.; JÚNIOR, A. C. *Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de ramos semilenhosos de pessegueiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 37, n. 7, p. 939-944, 2002.

TOFFANELLI, M. B. D.; CHALFUN, N. N. J.; HOFFMANN, A.; ANTUNES, L. E. C. *Enraizamento de estacas lenhosas e semilenhosas de cultivares copa de pessegueiro em diferentes concentrações de ácido indolbutírico. Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 19, n. 2, p. 259-263, 1997.

TOMMASI, F.; SCARAMUZZI, F. *In vitro propagation of Ginkgo biloba by using various bud cultures. Biology Plantarum*, United States, v. 48, n. 2, p. 297-300, 2004.

TORRES, A.C., CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, Brasília, 1998.

TREDICI, P. del. *Ginkgos and people: a thousand years of interaction. Arnoldia*, Netherlands, n. 51, p. 2-15, 1991.

TREDICI, P. del. *Natural regeneration of Ginkgo biloba from downward growing cotyledonary buds (basal chichi). American Journal of Botany*, Netherlands, n. 79, p. 522-530, 1992.

TREVISAN, R.; SCHWARTZ, E.; KERSTEN, E. *Capacidade de enraizamento de estacas de ramos de pessegueiro (Prunus persica (L.) Batsch) de diferentes cultivares. Revista Científica Rural*, Bagé, v. 5, n. 1, p. 29-33, 2000.

TULECKE, W. *Studies on tissue culture derived from Ginkgo biloba L. Phytomorphology*, California, v. 17, p. 381-386, 1967.

USP. *Descrição botânica da Ginkgo biloba*. Disponível em: <<http://www.usp.br/departfitotec/botanica/ginkgobiloba.htm>>. Acesso em: 11 mar. 2005.

VARNIER, M. L. *Produção de calos embriogênicos e regeneração de plantas em genótipos de milho para manipulação genética*. 2004. 177 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2004.

VIEIRA, M. L. C.; GLÓRIA, B. A. *Fundamentos e aplicações da cultura de tecidos no melhoramento*. USP/ESALQ, 2002. p. 915-917.

VITABRASIL. *Ginkgo biloba*. Disponível em: <[http://www.vitabrasilnet.com.br/ginkgo\\_biloba.htm](http://www.vitabrasilnet.com.br/ginkgo_biloba.htm)>. Acesso em: 11 mar. 2005.

WHITE, P. R. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa – SPI/ Embrapa-CNPQ, v. 1, 1998. p. 183.

WILKIN, J.; DOODS, J. H. In: DOODS, J. H.; ROBERTS, L. W. *Experiments in plant tissue culture*. 3 Ed. Cambridge University Press. 1999.

WILLIAMS, E. G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group. *Ann. Botany, United States*, v. 57, p. 443-462, 1986.

YU, R. M.; GAO, Y.; SONG, L.Y.; et al. *The immobilized cells culture of Ginkgo biloba and the production of ginkgolides*. *Acta Botanica Yunnanica, Japan*, v. 26, n. 3, p. 338-344, 2004.

## **APÊNDICES**



**Apêndice 1.** Análise do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para porcentagem total de calos aquosos (CA), calos organogênicos (CO) e calos necrosados (CN) de *Ginkgo biloba* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de isolamento WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003

Meio	Média dos dados			Média das ordens		
	CA	CO	CN	CA	CO	CN
1	0,00000	0,00000	0,00000	33,5000	16,5000	27,0000
2	0,10000	0,40000	0,50000	37,0000	30,5000	44,5000
3	0,00000	0,80000	0,20000	33,5000	44,5000	34,0000
4	0,20000	0,50000	0,30000	40,5000	34,0000	37,5000
5	0,00000	0,70000	0,30000	33,5000	41,0000	37,5000
6	0,00000	0,80000	0,20000	33,5000	44,0000	34,0000
7	0,100000	0,60000	0,20000	37,0000	37,5000	34,0000

Valor do teste para CA = 1,099

Probabilidade (P=0,05) = 12,590

Valor do teste para CO = 14,113

Probabilidade (P=0,05) = 12,590

Valor do teste para CN = 4,056

Probabilidade (P=0,05) = 12,590

## Comparações múltiplas

Classe	Classe	Diferença observada			Diferença mínima significativa (P=0,05)		
		CA	CO	CN	CA	CO	CN
1	2	3,50000	14,00000	17,50000	26,83636	26,83636	26,83636
1	3	0,00000	<b>28,00000</b>	7,00000	26,83636	<b>26,83636*</b>	26,83636
1	4	7,00000	17,50000	10,50000	26,83636	26,83636	26,83636
1	5	0,00000	24,50000	10,50000	26,83636	26,83636	26,83636
1	6	0,00000	<b>28,00000</b>	7,00000	26,83636	<b>26,83636*</b>	26,83636
1	7	3,50000	21,00000	7,00000	26,83636	26,83636	26,83636
2	3	3,50000	14,00000	10,50000	26,83636	26,83636	26,83636
2	4	3,50000	3,50000	7,00000	26,83636	26,83636	26,83636
2	5	3,50000	10,50000	7,00000	26,83636	26,83636	26,83636
2	6	3,50000	14,00000	10,50000	26,83636	26,83636	26,83636
2	7	0,00000	7,00000	10,50000	26,83636	26,83636	26,83636
3	4	7,00000	10,50000	3,50000	26,83636	26,83636	26,83636
3	5	0,00000	3,50000	3,50000	26,83636	26,83636	26,83636
3	6	0,00000	0,00000	0,00000	26,83636	26,83636	26,83636
3	7	3,50000	7,00000	0,00000	26,83636	26,83636	26,83636
4	5	7,00000	7,00000	0,00000	26,83636	26,83636	26,83636
4	6	7,00000	10,50000	3,50000	26,83636	26,83636	26,83636

4	7	3,50000	3,50000	3,50000	26,83636	26,83636	26,83636
5	6	0,00000	3,50000	3,50000	26,83636	26,83636	26,83636
5	7	3,50000	3,50000	3,50000	26,83636	26,83636	26,83636
6	7	3,50000	7,00000	0,00000	26,83636	26,83636	26,83636

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis



**Apêndice 2.** Teste não-paramétrico de comparação de médias Kruskal-Wallis para calos organogênicos aos 30 dias. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003

<b>Subcultivo</b>	<b>Tratamentos significativos a 5% (P=0,05)</b>
<b>1 (30 dias)</b>	T 1 x T 3 *
	T 1 x T 6

\* Comparações de médias entre os tratamentos



**Apêndice 3.** Análise do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para porcentagem total de calos aquosos (CA), calos organogênicos (CO) e calos necrosados (CN) de *Ginkgo biloba* aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de isolamento WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003

Meio	Média dos dados			Média das ordens		
	CA	CO	CN	CA	CO	CN
1	0,00000	0,00000	0,00000	20,5000	15,0000	20,5000
2	0,20000	0,40000	0,40000	25,5000	25,0000	30,5000
3	0,25000	0,50000	0,25000	26,7500	27,5000	26,7500
4	0,57143	0,42857	0,00000	34,7857	25,7143	20,5000
5	0,00000	0,85714	0,14286	20,5000	36,4286	24,0714
6	0,25000	0,50000	0,25000	26,7500	27,5000	26,7500
7	0,14286	0,28571	0,42857	24,0714	22,1429	31,2143

Valor do teste para CA = 4,790

Probabilidade (P=0,05) = 12,590

Valor do teste para CO = 8,765

Probabilidade (P=0,05) = 12,590

Valor do teste para CN = 3,613

Probabilidade (P=0,05) = 12,590

Comparações múltiplas

Classe	Classe	Diferença observada			Diferença mínima significativa (P=0,05)		
		CA	CO	CN	CA	CO	CN
1	2	5,00000	10,00000	10,00000	25,26355	25,26355	25,26355
1	3	6,25000	12,50000	6,250000	22,15760	22,15760	22,15760
1	4	14,28571	10,71428	0,00000	22,93530	22,93530	22,93530
1	5	0,00000	21,42857	3,57143	22,93530	22,9530	22,93530
1	6	6,25000	12,50000	6,25000	22,15760	22,15760	22,15760
1	7	3,57143	7,14286	10,71428	22,93530	22,93530	22,93530
2	3	1,25000	2,50000	3,75000	25,26355	25,26355	26,26355
2	4	9,28571	0,71428	10,00000	25,94832	25,94832	25,94832
2	5	5,00000	11,42857	6,42857	25,94832	25,94832	25,94832
2	6	1,25000	2,50000	3,75000	25,26355	25,26355	25,26355
2	7	1,42857	2,85714	0,71428	25,94832	25,94832	25,94832
3	4	8,03571	1,78572	6,25000	22,93530	22,93530	22,93530
3	5	6,25000	8,92857	2,67857	22,93530	22,93530	22,93530
3	6	0,00000	0,00000	0,00000	22,15760	22,15760	22,15760
3	7	2,67857	5,35714	4,46428	22,93530	22,93530	22,93530
4	5	14,28571	10,71428	3,57143	23,68747	23,68747	22,15760
4	6	8,03571	1,78572	6,25000	22,93530	22,93530	22,93530
4	7	10,71428	3,57143	10,71428	23,68747	23,68747	23,68747
5	6	6,25000	8,92857	2,67857	22,93530	22,93530	22,93530
5	7	3,57143	14,28571	7,14286	23,68747	23,68747	23,68747
6	7	2,67857	5,35714	4,46428	22,93530	22,93530	22,93530

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

**Apêndice 4.** Resumo da análise de variância para diâmetro inicial e final dos calos organogênicos de *Ginkgo biloba* avaliados aos 30 e 60 dias de cultivo em diferentes tratamentos no meio WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003

Causas de variação	GL	Quadrados médios							
		30 dias				60 dias			
		Diâmetro inicial	P	Diâmetro final	P	Diâmetro inicial	P	Diâmetro final	P
<b>Bloco</b>	9	0,1033	0,5579*	0,045	0,8871 <sup>ns</sup>	0,081	0,6464 <sup>ns</sup>	0,073	0,8652 <sup>ns</sup>
<b>Meio</b>	5	0,6522	0,0013	0,1286	0,2886	0,2583	0,0769	0,037	0,9189
<b>Erro experimental</b>	26								
<b>Total</b>	40								
<b>C.V. (%)</b>		27,43		40,71		29,58		58,33	

\* Teste F significativo (P 0,05)

ns - não significativo em nível de 5% pela Anova

**Apêndice 5.** Análise do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para porcentagem total de calos aquosos (CA), calos organogênicos (CO) e calos necrosados (CN) de *Ginkgo biloba* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de isolamento WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004

Meio	Média dos dados			Média das ordens		
	CA	CO	CN	CA	CO	CN
5	0,33333	0,66667	0,00000	8,0000	5,0000	-
6	0,00000	1,00000	0,00000	6,0000	7,0000	-
7	0,00000	1,00000	0,00000	6,0000	7,0000	-
8	0,00000	1,00000	0,00000	6,0000	7,0000	-

Valor do teste para CA = 0,692

Probabilidade (P=0,05) = 7,810

Valor do teste para CO = 0,692

Probabilidade (P=0,05) = 7,810

Valor do teste para CN = -

Probabilidade(P=0,05)=7,810

Comparações múltiplas

Classe	Classe	Diferença observada			Diferença mínima significativa (P=0,05)		
		CA	CO	CN	CA	CO	CN
5	6	2,00000	2,00000	0,00000	7,56269	7,56269	7,56269
5	7	2,00000	2,00000	0,00000	7,56269	7,56269	7,56269
5	8	2,00000	2,00000	0,00000	7,56269	7,56269	7,56269
6	7	0,00000	0,00000	0,00000	7,56269	7,56269	7,56269
6	8	0,00000	0,00000	0,00000	7,56269	7,56269	7,56269
7	8	0,00000	0,00000	0,00000	7,56269	7,56269	7,56269

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

**Apêndice 6.** Resumo da análise de variância para diâmetro inicial e final dos calos organogênicos de *Ginkgo biloba* avaliados aos 30 e 60 dias de cultivo em diferentes tratamentos no meio WPM. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004

Causas de variação	GL	Quadrados médios							
		30 dias				60 dias			
		Diâmetro inicial	P	Diâmetro final	P	Diâmetro inicial	P	Diâmetro final	P
<b>Bloco</b>	2	0,0418	0,7263 <sup>ns</sup>	0,0339	0,7885 <sup>ns</sup>	0,1254	0,2437 <sup>ns</sup>	0,0029	0,8600 <sup>ns</sup>
<b>Meio</b>	3	0,1238	0,4554	0,1225	0,4973	0,020	0,5509	0,010	0,5254
<b>Erro experimental</b>	6								
<b>Total</b>	11								
<b>C.V. (%)</b>		46,96		49,95		25,39		23,97	

ns - não significativo em nível de 5% pela Anova

**Apêndice 7.** Resumo da análise de variância para número de gemas formadas por calo organogênico de *Ginkgo biloba* aos 30 e 60 dias de cultivo em diferentes tratamentos no meio MS. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004

Causas de variação	GL	Quadrados médios			
		Número de gemas formadas por calo organogênico			
		30 dias		60 dias	
		P		P	
<b>Bloco</b>	9	2,4950	0,0646*	0,5205	0,7439 <sup>ns</sup>
<b>Meio</b>	8	2,8027	0,0425	0,5898	0,6520
<b>Erro experimental</b>	72				
<b>Total</b>	89				
<b>C.V. (%)</b>		447,68		331,72	

\* - significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan

ns - não significativo em nível de 5% pela Anova

**Apêndice 8.** Resumo da análise de variância para peso inicial e final dos calos organogênicos de *Ginkgo biloba* aos 30 e 60 dias de cultivo em diferentes tratamentos no meio MS. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004

Causas de variação	GL	Quadrados médios							
		30 dias				60 dias			
		Peso inicial	P	Peso final	P	Peso inicial	P	Peso final	P
<b>Bloco</b>	9	15509,72	0,5419 <sup>ns</sup>	10050,02	0,2582 <sup>ns</sup>	107448,25	0,8338 <sup>ns</sup>	4396,04	0,9534 <sup>ns</sup>
<b>Meio</b>	8	15984,04	0,4621	615,14	0,9996	169199,23	0,6144	5946,92	0,8850
<b>Erro experimental</b>	63								
<b>Total</b>	80								
<b>C.V. (%)</b>		54,93		71,44		108,92		153,95	

ns - não significativo pela Anova

**Apêndice 9.** Resumo da análise de variância para número de folhas e comprimento das brotações em ápices caulinares de *Ginkgo biloba* nos meios de cultura MS e WPM aos 30 dias de cultivo. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2005

Causas de variação	GL	Quadrados médios					
		30 dias					
		Frequência de brotação		Número de folhas		Comprimento das brotações	
		P		P		P	
<b>Bloco</b>	11	0,7401	0,0314*	0,9507	0,2923*	0,3201	0,6637 <sup>ns</sup>
<b>Meio</b>	1	3,0162	0,2351	5,0416	0,0197	0,3037	0,4108
<b>Erro experimental</b>	11						
<b>Total</b>	23						
<b>C.V. (%)</b>		38,72		79,04		271,42	

\* Teste F significativo (P 0,05)

ns - não significativo pela Anova

**Apêndice 10.** Resumo da análise de variância para número de folhas, gemas e comprimento das brotações em ápices caulinares de *Ginkgo biloba* nos meios de cultura MS e WPM aos 60 dias de cultivo. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2005

Causas de variação	GL	Quadrados médios					
		60 dias					
		Número de folhas*		Número de gemas		Comprimento das brotações*	
		P		P		P	
<b>Bloco</b>	11	0,9507	0,2923*	0,3750	0,6748 <sup>ns</sup>	0,3201	0,6637 <sup>ns</sup>
<b>Meio</b>	1	5,0416	0,0197	2,041	0,0674	0,3037	0,4108
<b>Erro experimental</b>	11						
<b>Total</b>	23						
<b>C.V. (%)</b>		79,04		51,23		271,42	

ns - não significativo pela Anova

\* Dados avaliados aos 30 dias de cultivo

**Apêndice 11.** Resumo da análise de variância para o efeito de doses de AIB e tipos de estacas de *Ginkgo biloba*, sobre a porcentagem de estacas vivas brotadas, não enraizadas e enraizadas. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004

Causas de variação	GL	Quadrados médios					
		% estacas brotadas	F	% estacas não enraizadas	F	% estacas enraizadas	F
<b>Doses de AIB</b>	2	145,63	1,13 <sup>ns</sup>	371,08	2,18 <sup>ns</sup>	86,85	1,65 <sup>ns</sup>
<b>Tipos de estaca</b>	1	475,22	3,70	551,49	3,24	0,00	0,00
<b>Doses de AIB x Tipos de estacas</b>	2	132,41	1,03	11,20	0,65	65,37	1,24
<b>Erro experimental</b>	18	128,50		170,05		52,52	
<b>Total</b>	23						
<b>C.V. (%)</b>		45,11		58,39		100,69	

ns - não significativo em nível de 5% pela Anova

Dados originais transformados em arc seno (raiz (x/100)) para efeito de análise estatística

**Anexo 1.** Composição da solução estoque dos Aminoácidos (Aa) de Norstog para embriões haplóides\*. FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2004

<b>aa de Norstog</b>	<b>0,5 mgL<sup>-1</sup> de água</b>	<b>1 mgL<sup>-1</sup> de água</b>	<b>0,25 mgL<sup>-1</sup> de água</b>
<b>L-alanina</b>	250	500	200
<b>L-arginina</b>	50	100	50
<b>L-cisteína</b>	100	200	100
<b>L-glutamina</b>	1000	2000	1000
<b>L-leucina</b>	50	100	50
<b>L-fenilalanina</b>	50	100	50
<b>L-tirosina</b>	50	100	50

\* Desta solução estoque usar 100 mL para 1L de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) + Aa de Norstog.