

## PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *LIMONIUM LATIFOLIUM* KUNTZE (PLUMBAGINACEAE)

### *IN VITRO* PROPAGATION OF *LIMONIUM LATIFOLIUM* KUNTZE (PLUMBAGINACEAE)

Claudimar Sidnei Fior<sup>1</sup> Lia Rosane Rodrigues<sup>2</sup> Atelene Normann Kämpf<sup>3</sup>

#### RESUMO

*Limonium latifolium* Kuntze é uma flor de corte cuja produção comercial de mudas é viabilizada através do cultivo de tecidos. Com o objetivo de aperfeiçoar o protocolo para a propagação clonal *in vitro*, fez-se uma sequência de estudos em que foram avaliados: viabilidade do uso de segmentos nodais do eixo da inflorescência imatura como explantes; tipos e concentrações de citocininas (cinetina-KIN e benzilaminopurina-BAP) na regeneração; tipos e concentrações de auxinas (ácido naftalenoacético-ANA e ácido indolbutírico-AIB) na fase de enraizamento *in vitro*; e técnicas de aclimação. Explantes oriundos de segmentos nodais da parte apical do eixo da inflorescência imatura são viáveis para a micropropagação de *L. latifolium*. Na fase de regeneração, os melhores resultados foram obtidos com o uso de meio de cultivo MS com 0,7mg de BAP/l por 35 dias. A fase de enraizamento *in vitro* foi feita com a manutenção dos explantes por 30 dias em meio MS acrescido de 1mg de AIB/l, garantindo ótimo índice de sobrevivência após a transferência para *in vivo*. A aclimação foi feita sob cobertura plástica, em bancada de casa de vegetação, à temperatura ambiente e com irrigação por nebulização. Utilizaram-se, como recipientes, bandejas multicelulares de isopor, com 242 células e aproximadamente 10cm<sup>3</sup> cada, preenchidas com casca de arroz carbonizada e esterilizada. As mudas receberam, quinzenalmente, adubação líquida com 0,5g/l de um adubo comercial (15:5:15+micronutrientes). O processo *in vitro* dura 100 a 120 dias e um explante origina 15 a 30 mudas.

**Palavras-chave:** *Limonium latifolium*, micropropagação, cultivo de tecidos.

#### SUMMARY

*Limonium latifolium* Kuntze is a cut flower commercially propagated *in vitro*. To develop and improve the

micropropagation protocol, a sequence of assays was developed to evaluate performance of node explants; effect of cytokinins concentration (kinetin-KIN and 6-benzyl-aminopurin-BA) on the regeneration rate; the presence of BA during the multiplication phase; concentration of naphthaleneacetic acid-NAA and indole3-butyric acid-IBA on the rooting phase and procedures for the acclimation *in vitro*. The micropropagation was done at commercial level using inflorescence nodes explants. By the regeneration phase the best results were obtained with BA at 0.7mg/l for 35 days in MS medium. The multiplication phase takes 35 days and shows satisfactory results with BA at 0.2mg/l, with the rate of 4 plantlets/explant. The rooting phase is takes 30 days in MS medium with IBA at 1mg/l, with good survival scores after transfer to *in vivo*. The acclimation has made under plastic covering, inside greenhouse with room temperature and intermittent mist, using flats with 242 cells of 10cm<sup>3</sup> each, filled with sterilized carbonized rice hulls. Every two weeks the plants were fertigated with commercial fertilizer (15:5:15 + micronutrients) at 0.5g/l. The *in vitro* process takes 100 - 120 days and one explant originates 15 - 30 plants.

**Key words:** *Limonium latifolium*, micropropagation, tissue culture.

#### INTRODUÇÃO

O género *Limonium* pertence à família *Plumbaginaceae* e envolve mais de 150 espécies, dispersas por áreas litorâneas de várias regiões tropicais e temperadas do planeta. Recentemente, no Japão e na Holanda, algumas espécies desse género passaram a ser cultivadas intensamente como flores

<sup>1</sup>Técnico Agrícola, Bolsista de Iniciação Científica FAPERGS, Departamento de Horticultura e Silvicultura, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av.: Bento Gonçalves, 7712, 91501-970, Porto Alegre - RS. E-mail: csfior@vortex.ufrgs.br. Autor para correspondência.

<sup>2</sup>Engenheiro Agrônomo, Mestre em Fitotecnia, Departamento de Horticultura e Silvicultura, Faculdade de Agronomia da UFRGS.

<sup>3</sup>Biólogo, Ph.D., Professor do Departamento de Horticultura e Silvicultura, Faculdade de Agronomia da UFRGS.

de corte, principalmente *L. sinuatum*, *L. bonduelli*, *L. dregeanum*, *L. sinense*, *L. psylliostachys*, *L. beilidifolium*, *L. gemlinii*, *L. perezii* e *L. Latifolium* (KUNITAKE *et al.*, 1995).

*Limonium latifolium* é popularmente conhecida no Sul do Brasil como latifólia. LORENZI & SOUZA (1995) citam ainda como nomes vulgares cáspia e lavanda do mar; este, como tradução do nome em inglês *sea lavender*. Trata-se de uma planta herbácea, nativa da Rússia, da Bulgária e do Cáucaso, com folhas basais em roseta. A inflorescência em panícula aberta, vistosa, alcança de 60 a 120cm de altura. As pequenas flores, de cor variável entre branca, rosa e azulada, são utilizadas frescas ou desidratadas em arranjos e buques, pois, mesmo depois de secas, continuam ornamentais, mantendo-se presas ao pedúnculo (LORENZI & SOUZA, 1995).

No Rio Grande do Sul, o cultivo comercial de latifólia teve início na década de 80 por imigrantes japoneses. Apesar do volume de comercialização ainda pequeno, se comparado com as demais flores de corte, o alto valor comercial da inflorescência e o relativo baixo custo de produção justificam seu cultivo. A reprodução sexuada de latifólia é viável, mas não é satisfatória sob o ponto de vista econômico. As sementes apresentam germinação deficiente e geram plantas geneticamente segregantes. A produção eficiente de lotes homogêneos exige propagação clonal *in vitro* e, assim, o produtor encontra dificuldades na obtenção de mudas.

KUNITAKE *et al.* (1995) desenvolveram cultivo de calos a partir de suspensões de células de *L. perezii* Hubbard, com o objetivo de obter protoclones, os quais apresentaram taxas pouco significativas de variação somaclonal. Mas, apesar de sua viabilidade, o cultivo de calos não é vantajoso para a propagação clonal. Na Polónia, BACH & PAWLOVSKA (1992) obtiveram resultados positivos com a organogênese direta. Esses autores submeteram segmentos nodais de genótipos locais de *L. latifolium* a meio de regeneração MS, contendo cinetina (KIN) a 0,5mg/l e ácido naftalenoacético (ANA) a 1mg/l. O enraizamento dos explantes foi satisfatório mesmo na ausência de fitoreguladores e a sobrevivência, após a transferência para *in vitro*, foi de 98%. Grolli *et al.* (1993) utilizaram retângulos foliares como explante para a micropropagação de latifólia no Laboratório de Biotecnologia em Horticultura da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Esses autores observaram que tais tecidos permanecem inalterados por longo tempo após a inoculação em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), tanto na presença como na ausência de fitoreguladores. A utilização de explantes foliares apresenta inconvenientes

como alta percentagem de oxidação e contaminação, exigindo intervalo mínimo de 40 dias até o início da regeneração do tecido (ROR & KÄMPF, 1996).

A fim de melhorar a eficiência da micropropagação clonal de *L. latifolium* em escala comercial, foram desenvolvidos estudos com os seguintes objetivos: (i) verificar a viabilidade do uso de segmentos nodais do eixo da inflorescência imatura como explantes; (ii) desenvolver protocolos e meios de cultivo específicos para a espécie em estudo; (iii) comparar tipos e concentrações de citocininas que promovam redução no período de regeneração dos explantes e induzam brotações favoráveis à multiplicação; (iv) comparar tipos e concentrações de auxinas que favoreçam enraizamento mais eficiente e maior sobrevivência à aclimatização; (v) estabelecer procedimentos eficientes para a aclimatização das mudas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi executado nas dependências do Laboratório de Biotecnologia em Horticultura (LBH) da Faculdade de Agronomia da UFRGS em Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As plantas matrizes foram mantidas em bancadas de casa de vegetação à temperatura ambiente. Os cultivos *in vitro*, utilizaram o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) a pH 5,8 e 3% de sacarose. Durante as fases *in vitro* as plantas foram mantidas em uma sala de crescimento a temperaturas em tomo de 24 a 29°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 2000 a 2500lux emitida por lâmpadas fluorescentes de 40W.

O trabalho foi dividido em três estudos, a fim de simplificar sua execução e avaliação. Grande parte do método empregado advém de observações anteriores, feitas durante quatro anos, através de pequenos ensaios. No primeiro estudo, avaliou-se, de forma comparativa a trabalhos realizados neste Laboratório, a viabilidade do uso de segmentos nodais do eixo da inflorescência imatura como explantes, mensurando-se o potencial de regeneração. Também se avaliaram a percentagem de oxidação e a de contaminação com resultados obtidos quando da utilização de explantes formados por discos foliares. Foram utilizadas 50 parcelas constituídas por frasco de vidro do tipo *snap cap* com 6,0cm de diâmetro e 8,0cm de altura, com 20ml de meio de cultivo MS + 0,2mg de Benzilaminopurina(BAP)/l + 0,1mg de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>)/l . Porções de ramos de inflorescências imaturas foram retiradas das plantas matrizes e submetidas à assepsia, que consistiu na escovação das estacas com detergente neutro, lavagem em água corrente, imersão em solução de álcool 70% por 1 minuto e imersão em solução de

hipoclorito de sódio (NaOCl) 1% por 10 minutos. Por último, os segmentos foram lavados três vezes em água deionizada.

Os segmentos nodais foram separados das inflorescências na câmara de fluxo de ar laminar estéril. Utilizaram-se explantes padronizados em tamanho, apresentando, no máximo, 5mm de comprimento e 3mm de espessura. Foram inoculados seis explantes por parcela, e mantidas em sala de crescimento com disposição aleatória. A avaliação foi feita em duas ocasiões, aos 20 e aos 40 dias após a inoculação, para uma posterior comparação com resultados de ensaios anteriores, nos quais foram utilizados explantes de discos foliares.

No segundo estudo, foi realizado um experimento em que se testou o efeito de duas citocininas: BAP e KIN, em quatro concentrações, na fase de regeneração de segmentos nodais do eixo da inflorescência imatura. A assepsia e a preparação dos explantes seguiram os mesmos procedimentos do estudo anterior. Foram inoculados três explantes em cada frasco, cada um com 20ml de meio de cultivo MS, acrescido de citocininas nas diferentes concentrações, constituindo os tratamentos: testemunha, sem citocininas; BAP e KIN nas concentrações 0,35; 0,7; 1,5; e 3,0mg/l. O experimento teve delineamento completamente casualizado com nove tratamentos e dez repetições. Após 50 dias, foi avaliada a taxa de regeneração, através da contagem do número de brotações vegetativas, do número de brotações florais e do número de calos por parcela. Os resultados foram submetidos à análise da regressão e à análise da variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

No terceiro estudo, comparou-se quantitativamente o efeito das auxinas ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB) em diferentes concentrações no meio de cultivo MS sobre o enraizamento, a sobrevivência e a aclimatização *in vitro*. Para tanto, foram utilizadas plantas obtidas pelo cultivo no meio de multiplicação empregado com maior sucesso para latifolia no LBH: MS acrescido de BAP a 0,2mg/l. Essas plantas apresentavam tamanho médio de 1,5cm desde o colo até o ápice foliar e não possuíam sistema radicular. Neste experimento, foram realizados nove tratamentos: testemunha (sem auxinas), AIB e ANA nas concentrações 0,50; 0,75; 1,00 e 1,50mg/l. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com nove tratamentos e 20 repetições. Excepcionalmente neste experimento, utilizaram-se tubos de ensaio, tamanho 150 x 25mm, com 10ml de meio de cultivo e uma planta por tubo. As plantas foram transferidas do meio de multiplicação para o

meio de enraizamento em câmara de fluxo de ar laminar estéril. Após a inoculação, as plantas permaneceram por 32 dias em sala de cultivo. Nesse período, foram feitas avaliações das seguintes variáveis: número de raízes, comprimento de raízes, número de folhas e comprimento de folhas.

No 32º dia após a instalação do experimento, as plantas foram retiradas dos tubos de ensaio e procedeu-se uma poda das folhas mais velhas, mantendo-se apenas as de melhor aspecto, não menos do que cinco. O comprimento das folhas foi padronizado através de uma poda apical. Logo em seguida, foram transferidas para bandejas multicelulares de isopor com 242 células de aproximadamente 10cm<sup>3</sup> cada, em disposição aleatória. O substrato utilizado constituiu-se de casca de arroz carbonizada e esterilizada.

Nos primeiros quinze dias, as bandejas permaneceram dentro de casa de vegetação, sobre um estrado e envoltas em uma moldura de madeira coberta por plástico transparente, a fim de manter a umidade relativa do ar em níveis elevados. A irrigação até esse período foi feita manualmente de maneira a manter sempre o substrato umedecido. Nessa ocasião, procedeu-se a contagem das plantas sobreviventes. A partir do décimo quinto dia, iniciou-se a aplicação, quinzenal, de adubação líquida com 0,5g/l de um adubo comercial (15:5:15+micronutrientes). Os resultados foram submetidos à análise da variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo em que se testou o desempenho de segmentos nodais do eixo da inflorescência imatura como explantes (Tabela 1), observou-se o início da regeneração ao 20º dia, com a emissão de pequenas brotações a partir das gemas. O índice total de contaminação foi de 25%, e não ocorreu oxidação.

Tabela 1 - Percentual de contaminação e oxidação e observações quanto à regeneração de explantes da inflorescência imatura de *L. latifolium* propagados *in vitro*.

Dias após inoculação	Contaminação %	Regeneração
20	25	60% dos explantes com brotações de até 2mm
40	25	100% dos explantes não contaminados apresentavam brotações vegetais e florais com até 20mm.

Aos 40 dias, observaram-se brotações em 100% dos explantes que não contaminaram, sendo algumas do tipo vegetativo, outras em forma de ramos de inflorescência; 40% das brotações já haviam atingido tamanho médio de 2cm.

A comparação com resultados de ensaios anteriores, em que se utilizaram retângulos foliares como explante, mostrou que o uso de segmentos nodais proporciona considerável redução no tempo de regeneração, o qual era de, no mínimo, 40 dias, sendo reduzido para aproximadamente 20 dias. Pôde-se constatar eliminação total do problema de oxidação, redução de 70% da taxa de contaminação e aumento importante da taxa de regeneração dos explantes, pois GROLI *et al.* (1993) obtiveram apenas 17% de regeneração a partir de explantes foliares em meio MS com 1mg de BAP/l, enquanto que, neste trabalho, com a utilização do meio MS+0,7mg de BAP/l, o índice de regeneração dos explantes de segmento nodais foi de 100%, excluindo-se os contaminados.

No experimento em que se testaram diferentes concentrações de duas citocininas sobre a fase de regeneração, obtiveram-se os resultados constantes na tabela 2. A presença de cinetina estimulou a emissão de brotações florais, mostrando pouca eficiência para o tipo de brotação desejada. Esses resultados discordam daqueles obtidos por BACH & PAWLOVSKA (1992) que tiveram sucesso com o uso da cinetina para a espécie *L. latifolium*. Talvez esses autores tenham utilizado genótipos diferentes, obtendo respostas específicas. Em ensaios anteriores, foram observadas respostas significativamente diferentes entre as diversas variedades de *L. Latifo-*

*lium* a diferentes níveis e tipos de fitorreguladores. Dentre as citocininas, no entanto, o BAP destacou-se pela sua eficiência na fase de regeneração de segmentos nodais de ramos da inflorescência imatura para todas as variedades utilizadas nos trabalhos do LBH.

A indução de brotações vegetativas foi maior no tratamento com 0,7mg de BAP/l, mas as emissões de brotações florais e de calos também foram elevadas neste tratamento, mostrando o grande potencial morfogênico dessa citocinina. Foi verificado que concentrações elevadas de BAP estimulam a emissão de poucas e pequenas brotações vegetativas de aparência promissora, com ramos espessos e coloração verde escura, entretanto, o lento crescimento impediu o aproveitamento nas fases seguintes do processo de micropropagação, o que deve ser estudado em ensaios posteriores visando ao aproveitamento dessas brotações.

A partir desses resultados, observou-se que os segmentos nodais do eixo da inflorescência imatura não emitem brotações vegetativas na ausência de citocininas. Nesse caso, ocorre apenas a emissão indesejável de poucas brotações florais, as quais morrem após alguns dias, o que também foi observado nos tratamentos com KIN e na concentração de 0,35mg de BAP/l.

A análise da regressão (Tabela 3) mostrou que há relação de causa e efeito entre as concentrações das citocininas e o número de brotações florais, brotações vegetativas e calos durante a regeneração *in vitro*. Entretanto, o uso das equações para interpolação e extrapolação para concentrações maiores que 1,5mg de BAP/l não é recomendável.

Os coeficientes de determinação foram elevados, considerando que 98% da variação no número de brotações florais e 98% da variação no número de brotações vegetativas foram explicadas pelas diferentes concentrações de BAP no meio de cultivo, e que 75% da variação no número de brotações florais e 96% da variação no número de brotações vegetativas foram explicadas pelas diferentes concentrações de KIN no meio de cultivo (Tabela 3).

No terceiro estudo, em que foram testados diferentes tipos e concentrações de auxinas (Tabela 4), observou-se que o acréscimo de ANA ao meio de enraizamento não trouxe resultados superiores àquele obtido com o tratamento testemunha no que se refere ao índice de sobrevivência *in vitro*. Com o uso de ANA nas concentrações 0,5 e 0,75mg/l, obtiveram-se o maior desenvolvimento foliar em número e comprimento de folhas, e formação de raízes curtas e numerosas. Porém, as plantas

Tabela 2 - Número de brotações vegetativas, brotações florais e calos emitidos por explante de *L. Latifolium* mediante diferentes concentrações de citocininas no meio de regeneração.

Tratamentos	Número médio por explante		
	Brotações Vegetativas	Brotações Florais	Calos
Testemunha	0,00c	1,00e	0,00 b
0,35mg BAP/l	3,63b	6,88abc	0,88ab
0,70mg BAP/l	6,11a	7,56a	0,89a
1,50mg BAP/l	2,75b	4,00cd	0,25ab
3,00mg BAP/l	0,38c	3,13de	0,38ab
0,35mg KIN/l	0,00c	5,38abcd	0,75ab
0,70mg KIN/l	0,25c	5,13bcd	0,88ab
1,50mg KIN/l	0,00c	5,67abcd	0,50ab
3,00mg KIN/l	1,00c	7,50ab	0,38ab

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5%.

Tabela 3 - Coeficientes de determinação e equação da regressão das variáveis avaliadas mediante as concentrações dos fitoreguladores testados na micropropagação de *L. Latifolium*.

Tratamento	Variáveis avaliadas (por explante)	r <sup>2</sup> (%)	Equação de regressão
ESTUDO 2			
Concentrações de BAP	Nº de brotações florais	98	$y(x \geq 1,5) = +3,9657x^3 - 18,623x^2 + 20,83x + 1,1772$
	Nº de brotações vegetais	98	$y(x \geq 1,5) = +2,9264x^3 - 14,388x^2 + 17,008x - 0,1735$
	Nº de calos	97	$y(x \geq 1,5) = +0,6524x^3 - 2,9465x^2 + 3,0841x + 0,0338$
Concentrações de KIN	Nº de brotações florais	75	$y = -0,8105x^2 + 4,0941x + 2,3146$
	Nº de brotações vegetais	96	$y = +0,2141x^3 - 0,7601x^2 + 0,7001x - 0,0408$
	Nº de calos	99	$y(x \geq 2) = +0,4791x^3 - 2,2845x^2 + 2,6621x + 0,0196$
ESTUDO 3			
Concentrações de ANA	Nº de folhas	75	$y = +9,7733x^3 - 24,118x^2 + 13,833x + 8,8361$
	Nº de raízes	82	$y = +38,947x^3 - 100,01x^2 + 60,383x + 4,9174$
	Comprimento de raízes	84	$y = -757x + 10,55$
Concentrações de AIB	Nº de folhas	96	$y = -6,0133x^3 + 12,743x^2 - 5,9517x + 8,9112$
	Nº de raízes	14	$y = -5,9067x^3 + 12,244x^2 - 4,8698x - 5,3182$
	Comprimento de raízes	22	$y = +2,495x^2 - 2,4563x + 11,934$

obtidas desses tratamentos apresentaram uma taxa de sobrevivência igual a das plantas do tratamento testemunha, sem auxinas, o que demonstra que seu uso não traz vantagens de ordem prática.

Plantas submetidas ao enraizamento em presença de ANA, nas concentrações 1,0 e 1,5mg/l, mostraram pequeno desenvolvimento foliar, número e comprimento de raízes *in vitro* significativamente menores em comparação com os demais tratamentos. O efeito tóxico dessa auxina foi comprovado pela alta mortalidade na aclimatização, quando as perdas alcançaram 90 e 73,7%, respectivamente.

O uso de AIB no meio de enraizamento mostrou resposta mais favorável, sem efeito tóxico em maiores concentrações. As plantas submetidas a essa auxina apresentaram maior número de folhas com desenvolvimento intermediário em relação aos demais tratamentos, além de raízes longas e pouco numerosas. A sobrevivência à aclimatização foi igual ou melhor que a do tratamento testemunha.

O uso de 1mg de AIB/l, no meio de cultivo da fase de enraizamento, mostrou-se vantajoso, pois garantiu 100% de sobrevivência das plantas. Apesar da avaliação estatística não ter detectado diferença significativa no índice de sobrevivência entre os tratamentos testemunha e 1mg de AIB/l, esta diferença é expressiva em nível de produção comercial de mudas, levando-se em consideração a necessidade de formação de lotes homogêneos para a comercialização e o alto custo de produção.

Tabela 4 - Comprimento de folhas e raízes, número de folhas e raízes, e percentual de sobrevivência de plantas de *L. Latifolium* formadas mediante cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de auxinas: ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB).

Tratamentos	Folhas		Raízes		Sobrevivência (%)
	Número	Comprimento	Número	Comprimento	
Testemunha	8,90bc	3,14cd	5,16bcde	11,84ab	84,21ab
0,50mg ANA/l	10,37a	4,37a	12,79a	5,74c	84,21ab
0,75mg ANA/l	10,79a	4,36a	14,26a	5,47c	84,21ab
1,00 mg ANA/l	7,75c	2,37e	2,05e	0,26d	10,00c
1,50 mg ANA/l	8,37bc	2,66de	2,15de	1,05d	26,31c
0,50 mg AIB/l	8,47bc	3,65abc	6,63bc	12,63a	89,47ab
0,75 mg AIB/l	8,90bc	3,30bcd	3,53cde	8,68bc	73,68b
1,00 mg AIB/l	9,79ab	4,08ab	8,21b	13,68a	100,00a
1,50 mg AIB/l	8,35bc	3,84abc	5,47bcd	13,42a	85,00ab

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5%.

Em geral, o índice de sobrevivência das plantas se mostrou independente do grau de desenvolvimento *in vitro*. É possível que o AIB tenha tido um efeito potencializador do enraizamento *ex vitro*, o que justifica a boa resposta das plantas submetidas a 1mg de AIB/l, manifestada apenas após a sua transferência para o substrato. Os melhores resultados em índices satisfatórios de sobrevivência à aclimatização *ex vitro* foram observados em ensaios anteriores, quando se proporcionou alta umidade do ar no período imediatamente subsequente à retirada das plantas do ambiente *in vitro*, diminuindo-a progressivamente após o décimo segundo dia da fase de aclimatização.

A análise da regressão (Tabela 3) mostrou que há relação de causa e efeito entre a concentração de ANA e o número de folhas, o número de raízes e o comprimento de raízes. As equações da regressão para ANA expressam, matematicamente, a toxidez dessa auxina quando utilizada em concentrações superiores a 0,75 mg/l.

Os coeficientes de determinação para as concentrações de ANA foram elevados, considerando que 75% da variação no número de folhas por explante, 82% da variação no número de raízes por explante e 84% da variação no comprimento de raízes foram explicadas pelas diferentes concentrações de ANA no meio de enraizamento. 96% da variação no número de folhas por explante foi explicada pelas diferentes concentrações de AIB. Entretanto, o coeficiente de determinação atingiu valores baixos, de 14 e 22%, respectivamente, para o efeito das concentrações de AIB sobre o número de raízes e comprimento de raízes por explante (Tabela 3). Tal resultado sugere que o efeito do AIB no meio de enraizamento favoreceu o equilíbrio hormonal e, conseqüentemente, o equilíbrio nutricional, viabilizando a formação de plantas com boas condições para a aclimatização.

Os resultados deste trabalho diferem daqueles propostos por GROLLI *et al.* (1993) por utilizar explantes do eixo da inflorescência, por dispensar uso de água de coco no meio de cultivo e por fazer uso preferencial do meio sólido. Também diferem do protocolo de BACH & PAWLOVSKA (1992) quanto à concentração de fitoreguladores no meio *in vitro* e às condições de aclimatização *ex vitro*, pois esses autores utilizaram recipientes individualizados e substrato composto por turfa, perlita e areia. O uso da casca de arroz carbonizada e esterilizada, é bastante conveniente e econômico no Rio Grande do Sul, reduzindo custos na produção comercial de mudas.

Dessa forma, o protocolo de propagação clonal através do cultivo de tecidos foi melhorado

em diversos aspectos. A fase de regeneração dura, em média, 40 dias e permite a diferenciação de tecidos vegetativos a partir de porções do ramo da inflorescência. A fase de multiplicação, que dura também 40 dias, permite a obtenção de até quatro plantas a partir de uma brotação vegetativa. A fase de enraizamento requer de 30 a 40 dias, totalizando 100 a 120 dias de cultivo *in vitro*, nos quais um explante inicial pode originar 15 a 30 mudas.

## CONCLUSÕES

Explantos oriundos dos segmentos nodais do eixo da inflorescência imatura viabilizam a produção de mudas de *L. latifolium* em larga escala. No entanto, esses explantes não emitem brotações vegetativas na ausência de citocininas. A utilização de 0,7mg de BAP/l no meio de regeneração é favorável à organogênese direta. No meio de enraizamento, concentrações de ANA maiores que 1mg/l mostraram-se fitotóxicas, enquanto o uso de 1mg de AIB/l garante maior sobrevivência das plantas à aclimatização *in vitro*.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração do técnico agrícola César Gois Prestes e do bolsista Rafael Henrique Schüilr Daudt. O desenvolvimento deste trabalho foi viabilizado através da concessão de bolsas pela FAPERGS e pelo CNPq.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACH, A., PAWLOVSKA, B. Micropropagation of perennial species of *Limonium* (*Limonium tataricum* L., *L. Latifolium* (Sm) O. Kuntze). *Zeszyty-Naukowe-Akademie-Rolniczej-imp-Hugona*, Krakowie, Poland, n.20, p.3-13,1992.
- FIOR, C.S., KÄMPF, A.N. Uso de segmentos nodais como explante para propagação *in vitro* de *Limonium latifolium*. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8, 1996, Porto Alegre. *Resumos...* Porto Alegre : UFRGS - PROPESP, 1996. p.96.
- GROLLI, P.R., SATO, F.K., VARGAS, J.F.R., *et al.* Propagação *in vitro* de *Limonium latifolium* (Sm) O. Kuntze. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1, 1993, Brasília. *Resumos...* Brasília: EMBRAPA, 1993. p.79.
- KUNITAKE, H., KOREEDA, K., MH, M. Morphological and cytological characteristics of protoplast-derived plants of statice (*Limonium perezii* Hubbard). *Scientia Horticulturae*, v.60,p.305-312, 1995.
- LORENZI, H.; SOUZA, H.M. *Plantas ornamentais no Brasil - arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. Nova Odessa : Plantarum, 1995. 720p.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantamm*, Kopenhagen, v.15, p.473-497, 1962.