

DIDONÉ SF; GRANDO MF; CALVETE EO; COSTA AR; SUZIN M; AUGUSTIN L. 2015. Micropropagação de alcachofra a partir de plântulas germinadas *in vitro*. *Horticultura Brasileira* 33: 311-318. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620150000300006>

Micropropagação de alcachofra a partir de plântulas germinadas *in vitro*

Silvana F Didoné; Magali F Grando; Eunice O Calvete; Angélica R Costa; Marilei Suzin; Lizete Augustin

Universidade de Passo Fundo (UPF-FAMV), Passo Fundo-RS, Brasil; sillvanad@gmail.com; magali@upf.br; calvete@upf.br; angelreolon@hotmail.com; suzin@upf.br; augustin@upf.br

RESUMO

A alcachofra é uma hortaliça consumida tanto *in natura* quanto industrializada. Seu alto valor nutricional e medicinal desperta interesse pelo seu cultivo no Brasil. A micropropagação é uma técnica que permite a produção de populações homogêneas e a rápida multiplicação de progênies selecionadas. Este trabalho objetivou estabelecer um protocolo de micropropagação para progênies de alcachofra, utilizando explantes obtidos de plântulas germinadas *in vitro*. Nós cotiledonares de três progênies (P1, P2 e P3) foram avaliados quanto à taxa de multiplicação, altura e número de folhas, ao longo de quatro subcultivos sucessivos, em dois meios de cultura (M1 e M2). Na fase de enraizamento *in vitro* foram avaliados o enraizamento de mudas (%), o comprimento da maior raiz (cm) e o volume de raiz (cm³). E, na fase de aclimatização foi avaliada a taxa de sobrevivência das brotações com e sem raízes, aos 30 dias do transplante, em três diferentes substratos. O meio de cultura M1 (1,0 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de ANA) promoveu maior desenvolvimento de brotos axilares e taxa média de multiplicação 5,1 para as progênies P1 e P2. A progênie P1 apresentou maior frequência de enraizamento *in vitro* das brotações (51,9%) em comparação com a progênie P2 (14,9%). Os substratos S1 (Mecplant Horta 2[®]: 100%) e S2 (Mecplant Horta 2[®]: 50% e casca de arroz carbonizada: 50%) foram os mais adequados para a aclimatização das mudas micropropagadas das progênies P1 e P2, respectivamente, sendo alcançada a frequência de sobrevivência de 75%. Foi possível estabelecer o processo de micropropagação de duas progênies de alcachofra, selecionadas para o consumo *in natura*, utilizando como fonte de explante nó cotiledonar obtido a partir de plântulas germinadas *in vitro*.

Palavras-chave: *Cynara cardunculus*, cultivo *in vitro*, taxa de multiplicação, enraizamento, aclimatização, substratos.

ABSTRACT

Artichoke micropropagation from *in vitro* germinated seedlings

Globe artichoke is a vegetable that can be consumed both fresh and industrialized, and its high nutritional and medicinal value arouses interest in its cultivation in Brazil. Micropropagation enables rapid multiplication of selected progenies. This study aimed to establish a micropropagation protocol for artichoke progenies using explants obtained from *in vitro* germinated seedlings. Cotyledon nodes of three progenies (P1, P2 and P3) were evaluated for multiplication rate, length and number of leaves over four successive subcultures on two media cultures (M1 and M2). In rooting phase percentage of rooted shoots, length of the longest root (cm) and root volume (cm³) were evaluated. In the acclimatization phase survival rate of shoots with and without roots was evaluated after 30 days of transplant in three different substrates. The culture medium M1 (1.0 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA) promoted the best development of the axillary shoots and the multiplication rate of 5.1 for the progenies P1 and P2. The P1 progeny showed higher frequency of *in vitro* shoot rooting (51.9%) compared to the progeny P2 (14.9%). The substrates S1 (Mecplant Horta 2[®]: 100%) and S2 (Mecplant Horta 2[®]: 50% and burned rice husk: 50%) were the most suitable for acclimatization of the micropropagated shoots of progenies P1 and P2, respectively, reaching a survival frequency of 75%. It was possible to establish the micropropagation for two progenies of artichoke selected for fresh consumption using as source of explant the cotyledon node obtained from *in vitro* germinated seedlings.

Keywords: *Cynara cardunculus*, *in vitro* cultivation, multiplication rate, rooting, acclimatization, substrates.

(Recebido para publicação em 9 de outubro de 2014; aceito em 17 de fevereiro de 2015)

(Received on October 9, 2014; accepted on February 17, 2015)

A alcachofra, *Cynara cardunculus* (Asteraceae), é uma hortícola oriunda do Mediterrâneo que apresenta alto valor nutritivo e medicinal (Pandino *et al.*, 2010). Essa hortaliça produz capítulos bem desenvolvidos que, quando imaturos, são utilizados na alimentação (Ierna *et al.*, 2012).

No Sul da Europa a alcachofra apresenta uma substancial importância econômica (Mauro *et al.*, 2009). A Itália

se destaca como o maior produtor mundial seguida da Espanha e França. Na América Latina a alcachofra é cultivada principalmente no Peru, Chile e na Argentina (Ierna *et al.*, 2012). No Brasil, a produção se concentra em São Paulo e representa fonte significativa de renda para os produtores (Camargo Filho *et al.*, 2009). O desenvolvimento de genótipos adaptados e com características que atendam às necessidades dos

produtores e do mercado consumidor é de grande importância para a maior difusão desta cultura no Brasil, especialmente no Rio Grande do Sul.

A Universidade de Passo Fundo iniciou um programa de melhoramento de alcachofra visando ao desenvolvimento de cultivares de polinização aberta para o consumo *in natura*, por meio da seleção recorrente (Reolon-Costa, 2014).

A alcachofra pode ser propagada

tanto via sexual quanto vegetativa, sendo que ambas apresentam limitações. A multiplicação por rebentos resulta na baixa taxa de multiplicação, disseminação de doenças, heterogeneidade do vigor da planta e no custo elevado de transplante das mudas para o campo (Ierna *et al.*, 2012). A desvantagem da propagação sexuada diz respeito à produção de descendência heterogênea devido à segregação genética, o que resulta no frequente aparecimento de plantas do tipo silvestre com capítulos pequenos e espinhosos (Cointry *et al.*, 1999).

A micropropagação de alcachofra permite a obtenção de populações homogêneas, livres de doenças, bem como a produção de clones superiores a partir de plantas selecionadas e o desenvolvimento de variedades sintéticas (Ancora *et al.*, 2012). Protocolos de micropropagação têm sido relatados para algumas cultivares tardias de alcachofra, principalmente na Itália (Ancora *et al.*, 1981; Lauzer & Vieth, 1990; Fortunato *et al.*, 2005; Bedini *et al.*, 2012).

Problemas de contaminação, baixa taxa de multiplicação e enraizamento estão entre os fatores que limitam a micropropagação da alcachofra (Lauzer & Vieth, 1990; Brutti *et al.*, 2000; Fortunato *et al.*, 2005; Bedini *et al.*, 2012). No Brasil, pesquisas relativas ao estabelecimento do cultivo *in vitro* de alcachofra têm sido realizadas na Universidade de Passo Fundo, principalmente com a cv. Nobre, sendo que os problemas relatados acima também têm sido considerados fatores limitantes na micropropagação desta cultivar (Grando *et al.*, 2011).

O ajuste da técnica de micropropagação para progênies selecionadas de alcachofra é de grande importância para o programa de melhoramento dessa espécie, visando futuramente à disponibilização de mudas de alta qualidade genética para atender a demanda dos produtores da região sul do Brasil.

Este trabalho objetivou estabelecer um protocolo de micropropagação para progênies de alcachofra selecionadas para o consumo *in natura*, utilizando como explantes nós cotiledonares obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em laboratório da Universidade de Passo Fundo (UPF), no período de 2010 a 2012.

Sementes de três progênies de uma população resultante da seleção recorrente do Programa de Melhoramento Genético de Alcachofra da UPF, denominadas P1(B2L4R6), P2(B1L4R7) e P3(B1L3R1) foram utilizadas como fonte de explantes. Estas progênies foram provenientes do cruzamento entre clones das cultivares Romanesca e Verde Redonda Melhorada, ambas pertencentes ao grupo *Romanesco* de alcachofra, selecionadas por apresentarem características desejáveis ao consumo *in natura* (Reolon-Costa, 2014).

Assepsia da semente, germinação *in vitro* e obtenção dos explantes

Para a desinfestação as sementes foram imersas em álcool 70% por 30 minutos, logo após, em hipoclorito de sódio a 1,5% de cloro ativo, por 10 minutos, e depois mantidas imersas em água esterilizada por 48 horas, no escuro, em câmara de fluxo laminar. O tegumento das sementes foi removido, em ambiente estéril, por meio de corte longitudinal com bisturi e da remoção com auxílio de uma pinça. Cinquenta sementes de cada progênie foram germinadas em meio de cultura MS completo suplementado com 2% de sacarose, 0,7% de ágar e pH ajustado para 5,8, em frascos de 200 mL contendo 20 mL de meio de cultura. Para cada progênie foram utilizados 10 frascos com 5 sementes em cada.

As culturas foram mantidas em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro por sete dias, e posteriormente transferidas para a luz por mais 14 dias, com fotoperíodo de 12 horas e irradiância de $36,75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Após 21 dias, explantes de nó cotiledonar (sem os cotilédones) medindo em torno de 2 cm (Figura 1a), foram utilizados para iniciar o cultivo *in vitro*.

Aos 21 dias de cultivo foi avaliada a taxa de germinação das sementes, bem como a presença de contaminação.

Fase de estabelecimento do cultivo *in vitro* - O nó cotiledonar foi cultivado em dois meios de cultura: meio M1, composto pelos macronutrientes do meio MS, micronutrientes de Nitsch

(Nitsch & Nitsch, 1969), metade da concentração de FeEDTA do meio MS, 0,4 mg/L de tiamina HCl, 100,0 mg/L de mio-inositol acrescido de 1,0 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,1 mg/L de ácido α -naftalenoacético (ANA); o meio M2 foi constituído de meio MS (macro e micronutrientes) com vitaminas B5 (Gamborg *et al.*, 1968) acrescido de 1,0 mg/L de 6-furfurilaminopurina (cinetina), 40,0 mg/L de sulfato de adenina e 50,0 mg/L de fosfato monossódico. Ambos os meios continham 2% de sacarose, 0,7% de ágar, pH ajustado para 5,8 e foram autoclavados por 20 min a 120°C e 1 atm.

O meio M1 foi utilizado com sucesso na UPF para a micropropagação da cv. Nobre a partir de ápices caulinares obtidos de plantas adultas (dados não publicados). Já o M2 (modificado de El Boullani *et al.*, 2012) foi usado na micropropagação de alcachofra a partir de brotos axilares de plântulas obtidas de sementes germinadas *in vitro* de um acesso oriundo do Marrocos.

Os tratamentos constaram de três progênies e dois meios de cultura, totalizando 6 tratamentos com 5 repetições. Cada repetição foi constituída por um frasco de vidro transparente (com capacidade de 200 mL), contendo 20 mL de meio de cultura, vedado com tampa plástica branca semitransparente, contendo um explante. O delineamento empregado foi inteiramente casualizado (DIC). As culturas foram mantidas por 30 dias em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas, com lâmpadas de luz fluorescentes sob intensidade de luz de $36,75 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

As variáveis avaliadas na fase de estabelecimento foram as frequências de contaminação e de desenvolvimento dos nós cotiledonares aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Fase de multiplicação - Decorridos 30 dias da fase de estabelecimento *in vitro* as brotações foram transferidas para a fase de multiplicação, empregando somente o meio de cultura M1, que promoveu maior frequência de desenvolvimento dos explantes na fase de estabelecimento. Utilizou-se somente as progênies P1 e P2 por apresentarem-se mais responsivas ao estabelecimento *in*

in vitro. Os explantes de nó cotiledonar da progênie P3 não se desenvolveram e não produziram brotações nos dois meios de estabelecimento utilizados.

As culturas foram mantidas em câmara de crescimento nas mesmas condições descritas para a fase de estabelecimento. Foram realizados quatro subcultivos consecutivos, a cada 30 dias. O delineamento experimental foi o DIC com 5 repetições. As repetições foram constituídas por um frasco de vidro transparente (200 mL), contendo 20 mL de meio de cultura, vedado com tampa plástica branca semitransparente, contendo 5 brotações (total de 25 explantes por tratamento). Os tratamentos foram constituídos de duas progênies.

Ao final de cada subcultivo foram avaliadas a taxa de multiplicação, a altura do broto (base do broto até a altura da maior folha em cm) e o número médio de folhas por broto. As variáveis altura e número de folhas/broto foram determinadas antes da separação dos brotos axilares para o próximo subcultivo. A taxa de multiplicação foi obtida mediante a contagem dos novos propágulos (brotos axilares) originados a partir do propágulo inicial.

Os dados foram submetidos à análise de variância e médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Pré-enraizamento e enraizamento - Após quatro subcultivos, um total de 54 brotações, 27 de cada progênie (P1 e P2), foi transferido para o meio de pré-enraizamento constituído de meio MS sem a adição de reguladores de crescimento e 30,0 g/L de sacarose e 6,0 g/L de ágar em frasco de vidro transparente (200 mL), contendo 20 mL de meio de cultura, vedado com tampa plástica branca semitransparente, contendo 1 brotação/frasco. Os mesmos permaneceram por 30 dias em câmara de crescimento sob as condições já descritas anteriormente. Após esse período todas as brotações apresentavam em torno de 3,5 cm de altura, sendo então transferidas para meio de enraizamento composto por macronutrientes do MS, micronutrientes de Nitsch (Nitsch & Nitsch, 1969), metade da concentração de FeEDTA do meio MS, 0,4 mg/L de tiamina HCl, 100,0 mg/L de mio-

-inositol acrescido de 10,0 mg/L de ácido indolil-3-acético (AIA) e 30,0 g/L de sacarose (Fortunato *et al.*, 2005), em frasco de vidro transparente (200 mL), contendo 20 mL de meio de cultura, vedado com tampa plástica branca semitransparente, contendo 1 brotação/frasco, permanecendo por mais 30 dias nesta etapa.

Nesta fase foram avaliadas frequência de enraizamento (%), comprimento da maior raiz (cm) e volume de raiz (cm³). O volume de raiz foi avaliado mergulhando o sistema radicular da planta numa proveta graduada contendo um volume inicial conhecido de água. O volume lido na proveta após o mergulho da raiz, descontando o volume inicial, foi utilizado para cálculo do volume de raiz em cm³ pela equivalência e unidades (1 mL = 1 cm³). O delineamento experimental foi o DIC, com 27 repetições por progênie, sendo a unidade experimental composta por uma brotação. A análise estatística foi realizada pela análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Aclimatização - Mudanças das progênies P1 e P2, medindo em média 5,0 cm, foram aclimatizadas em três diferentes substratos. Elas foram transferidas para vasos plásticos de 500 mL contendo 640 cm³ de substrato comercial Mecplant Horta 2 e casca de arroz carbonizada (CAC), em três diferentes concentrações: S1 = Mecplant Horta 2 100%, S2 = 50% substrato comercial Mecplant Horta 2 e 50% CAC e S3 = 100% CAC. A parte aérea das mudas foi inicialmente coberta por frascos de vidro transparente (500 mL) para evitar desidratação. Estes frascos foram inclinados gradativamente até serem completamente removidos após 10 dias de aclimatização. As mudas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura média de 25°C e fotoperíodo de 16 horas, com 43,5 μmol/m²/s de irradiância. Durante essa etapa as mudas foram irrigadas em sistema de *floating* em bandejas de alumínio medindo 40x25x5 cm, comportando um conjunto de 5 vasos. Os tratamentos (2 progênies x 3 substratos) foram distribuídos em DIC. Ao todo foram aclimatizadas 27 mudas de cada progênie nos três substratos, sendo que para

a progênie P1 14 mudas apresentavam raízes. Essas mudas foram equitativamente distribuídas nos três substratos. A progênie P2 apresentava apenas 4 mudas com raízes e 23 não apresentavam as mesmas. Estas mudas também foram divididas entre os três substratos para aclimatização. As mudas foram avaliadas quanto à sobrevivência, 30 dias após o transplante, sendo os dados expressos em percentagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Assepsia da semente, germinação *in vitro* e obtenção dos explantes - Aos 21 dias de cultivo *in vitro*, 100% das sementes das três progênies germinaram em meio MS sem a presença de contaminações. Desta forma, a utilização de explantes de plântulas de alcachofra, obtidas a partir da germinação de sementes *in vitro*, visando superar os problemas de contaminação, é uma estratégia adequada.

O uso de explantes excisados de plântulas de alcachofra, originadas de sementes germinadas *in vitro* foi anteriormente relatado por Lauzer & Vieth (1990) e El Boullani *et al.* (2012). Tentativas anteriores de estabelecer o cultivo *in vitro* dessas mesmas três progênies (P1, P2 e P3), a partir de explantes oriundos de plantas adultas cultivadas a campo ou em casa de vegetação foram infrutíferas (Didoné, 2013). A contaminação nas fases iniciais de cultivo *in vitro* tem sido considerada uma das limitações para a micropropagação nessa espécie (Lauzer & Vieth, 1990; Rossi & De Paoli, 1992; Bedini *et al.*, 2012). Este trabalho ratifica que os entraves relativos às contaminações *in vitro* podem ser superados pela utilização de explantes excisados de plântulas originadas da germinação *in vitro* de sementes, permitindo o estabelecimento do cultivo, sob condições assépticas, para três progênies de alcachofra empregadas neste estudo.

Fase de estabelecimento do cultivo *in vitro* - Somente os nós cotiledonares de duas progênies (P1 e P2) apresentaram desenvolvimento quando foram inoculados nos meios de cultura testados. Embora as sementes da progênie 3 tenham germinado *in vitro* e produzido

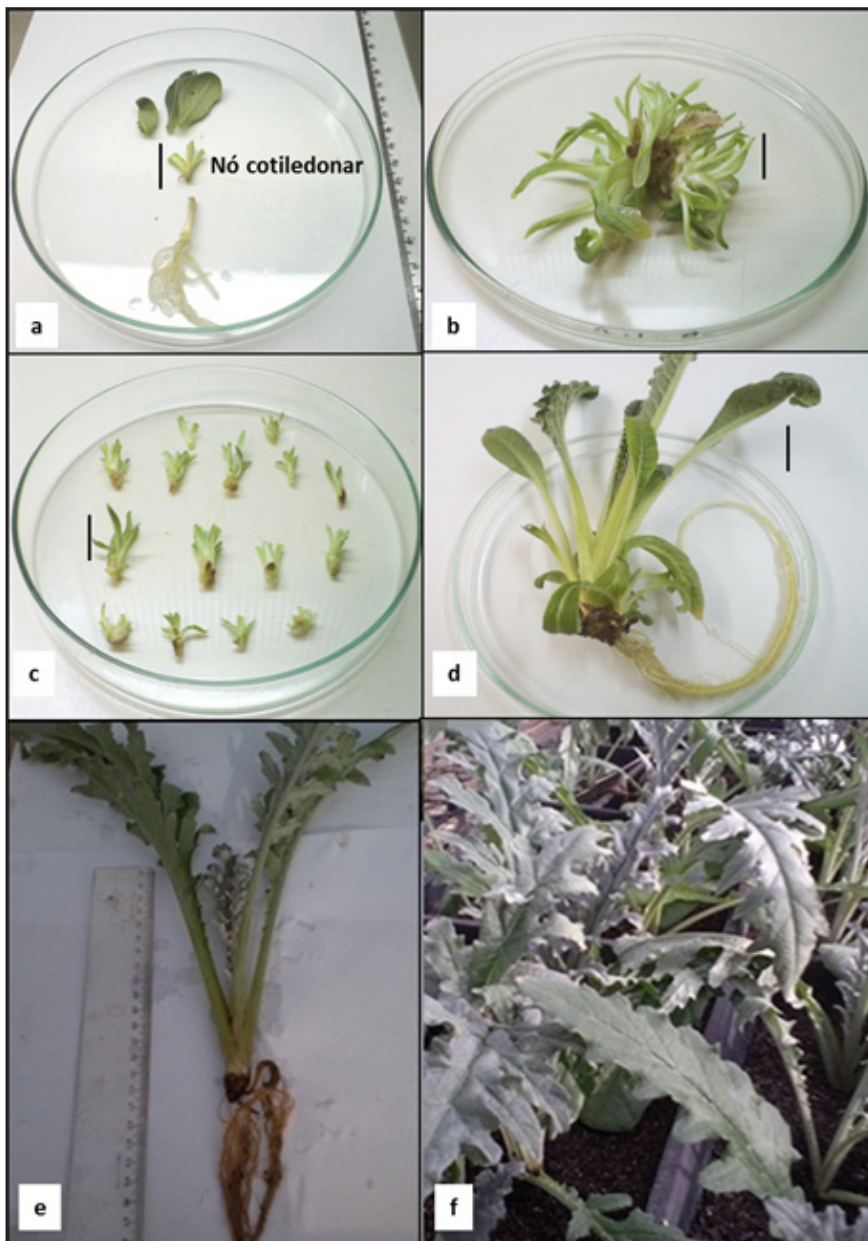


Figura 1 a= Plântula de alcachofra da progênie P1 obtida aos 21 dias a partir da germinação *in vitro* da semente; destaque para o explante de nó cotiledonar (artichoke seedling of progeny P1 *in vitro* germinated for 21 days showing the cotyledon node used as explants); b= Propágulo da progênie P1 contendo brotos axilares induzidos no meio de multiplicação, aos 30 dias no subcultivo II (P1 progeny of propagules containing induced axillary shoots in the culture medium, after 30 days in the subculture II); c= Brotações axilares da progênie P1 individualizadas para avaliação da taxa de multiplicação no subcultivo II (progeny P1 individualized axillary buds for multiplication rate evaluation at subculture II); d= Muda micropropagada da progênie P2 (progeny P2 micropropagated plantlet); e= Plantas de alcachofra da progênie P1 aclimatizadas apresentando raízes bem desenvolvidas, aos 60 dias após a aclimatização (artichoke plants of progeny P1 showing well-developed roots after 60 days of acclimatization); f= Plantas de alcachofra da progênie P1 após 60 dias de aclimatização em estufa semi-climatizada (barra = 2.0 cm) {artichoke plants of progeny P1 after 60 days of acclimatization in semi-heated greenhouse (bar = 2 cm)}. Passo Fundo, UPF, 2012.

nós cotiledonares saudáveis, os mesmos não se desenvolveram quando transferidos para a etapa de estabelecimento, evidenciando o efeito genotípico na capacidade de resposta *in vitro*. O meio de

cultura M1 promoveu maior frequência de desenvolvimento dos nós cotiledonares (100% para P1 e 80% para P2), comparado com o meio de cultura M2, que estimulou o desenvolvimento de

somente 20% dos explantes para ambos os genótipos. Em nenhum dos meios foi observado contaminação dos explantes.

A região do nó cotiledonar se desenvolveu promovendo a formação de brotos axilares utilizados no processo de multiplicação *in vitro*. O nó cotiledonar tem se mostrado uma fonte de explante eficiente para a proliferação de brotos axilares em várias espécies medicinais (Singh & Tiwari, 2010) e também em melão (Zhang *et al.*, 2011) e orquídeas (Rajanna *et al.*, 2011), mas não em alcachofra. Este é o primeiro relato de estabelecimento de micropropagação em alcachofra a partir de nós cotiledonares.

A combinação de citocinina (1,0 mg/L de BAP) e auxina (0,1 mg/L de ANA), utilizada no meio M1, estimulou a formação de brotos axilares. Este meio foi utilizado com sucesso para a micropropagação da alcachofra cv. Nobre, a partir de ápices caulinares obtidos de brotações de plantas adultas, mantidas no campo (dados não publicados). Já o meio M2 (1,0 mg/L de cinetina e 40,0 mg/L de sulfato de adenina), não se mostrou eficiente para o estabelecimento do cultivo *in vitro* das duas progênies avaliadas no presente experimento. Segundo Bedini *et al.* (2012), as citocininas mais utilizadas para indução de proliferação de brotos axilares, em alcachofra, são cinetina (1,0 mg/L a 5,0 mg/L), BAP (0,5 a 1,0 mg/L) ou isopenteniladenina (2iP) a 10,0 mg/L. O efeito positivo da combinação de cinetina e sulfato de adenina com 2iP foi reportado por Brutti *et al.* (2000) na multiplicação *in vitro* da cv. Early French.

Iapichino (1996) relatou que o BAP foi mais eficiente que outras citocininas, tais como N⁶-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil) aminopurina (zeatina), cinetina e 2iP na indução de brotos axilares, a partir de explantes obtidos de gemas dormentes subterrâneas, na cv. Violetto Spinoso di Sicilia. Segundo Lauzer & Vieth (1990), o uso de BAP nas concentrações de 0,5 a 1,0 mg/L combinado com 0,5 mg/L de ANA aumentou significativamente a taxa de multiplicação da cv. Green Globe a partir de ápices caulinares de plântulas germinadas *in vitro*. Neste trabalho a combinação de uma citocinina com uma auxina (BAP e ANA) foi favorável ao desenvolvimento

Tabela 1. Taxa de multiplicação, número de folhas e altura dos brotos (cm) de duas progênies de alcachofra em quatro subcultivos sucessivos em meio de multiplicação contendo MS modificado suplementado com 1,0 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de ANA {multiplication rate, average number of leaves and shoot length (cm) of two artichoke progenies in four successive subcultures in multiplication medium containing modified MS medium supplemented with 1.0 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA}. Passo Fundo, UPF, 2012.

Progênies	Subcultivos				Média
	I	II	III	IV	
Taxa de multiplicação					
P1	5,3 (2-11)†	6,4 (3,5-14)	3,5 (1,5-10)	3,5 (2-9)b	4,7
P2	4,0 (3-5)	6,5 (4-12)	4,4 (3-6)	6,8 (2,5-10)a	5,4
Média	4,7	6,5	4,0	5,2	5,1
CV (%)	53,79	60,15	61,71	57,11	
Número de folhas/broto					
P1	25,3 (11-49)†	43,5 (11-99)	20,9 (11-51)	21,2 (9-32)b	27,7
P2	21,3 (14-31)	47,5 (21-63)	26,1 (15-50)	45,5 (9-15)a	33,5
Média	23,3	45,5	23,5	33,4	31,4
CV (%)	47,73	53,41	65,32	78,89	
Altura dos brotos (cm)					
P1	5,33 (4-6) †	4,40 (2,5-9)	3,47 (2-7)b	3,37 (3-5,3)	4,14
P2	6,00 (5-7)	5,50 (4-7)	5,38 (3,7-7)a	3,63 (2,3-4,6)	5,13
Média	5,66	4,95	44,43	3,50	4,64
CV (%)	14,58	38,69	26,94	29,96	

Progênies P1= B2L4R6; P2= B1L4R7; †= amplitude; Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) {means followed by the same letter do not differ by Tukey test ($p < 0,05$)}; *Significativo a 5% pelo F teste (significant at 5% by F test); ns= não significativo (not significant).

Tabela 2. Brotações enraizadas, comprimento da maior raiz e volume de raiz em duas progênies de alcachofra no final da fase de enraizamento *in vitro* em meio MS contendo 10,0 mg/L de AIA (rooted shoots, length and volume of roots observed in two artichoke progenies at the end of the rooting phase on MS medium supplemented with 10 mg/L IAA). Passo Fundo, UPF, 2012.

Progênie	Brotações enraizadas (%)	Comprimento da maior raiz (cm)	Volume de raiz (cm ³)
P1	51,8 a	6,48 b	0,68 b
P2	14,8 b	12,88 a	2,30 a
Média	34,0	8,26	1,13
Valores de teste F			
Progênie	9,59 **	9,75**	8,21**
CV (%)	132,60	47,10	95,40

Progênie: P1= B2L4R6; P2= B1L4R7; Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste Tukey 5% (means followed by the same letter do not differ by Tukey test, 5%).

das brotações comparada ao uso de duas citocininas simultaneamente (cinetina e sulfato de adenina).

Fase de multiplicação - A taxa média de multiplicação ao longo dos subcultivos I, II e III não revelou diferença para os dois genótipos testados, exceto no subcultivo IV (Tabela 1).

No subcultivo I a taxa média de multiplicação foi 4,7. No entanto, a amplitude observada foi maior para a progênie P1, onde brotos individuais produziram

até 11 novas brotações axilares (Tabela 1). No subcultivo II, a taxa média de multiplicação aumentou para 6,5 (Figura 1b), constatando brotos que produziram 12 (P2) e 15 (P1) brotações axilares (Figura 1c). Nos subcultivos subsequentes ocorreu redução da taxa média de multiplicação para 4,0 (subcultivo III) e 5,2 (subcultivo IV), comparada com a do subcultivo II (6,5). No entanto, no último subcultivo, a progênie P2 apresentou taxa de multiplicação de

6,8, superior a P1 (3,5) (Tabela 1), o que indica a possível influência do genótipo para esta característica.

As taxas médias de multiplicação, ao longo dos quatro subcultivos, foram de 4,7 para a progênie P1 e 5,4 para a P2 (Tabela 1), considerado satisfatório para alcachofra, quando comparadas com valores relatados na literatura. Bedini *et al.* (2012) observaram, em quatro cultivares de alcachofra, uma taxa de multiplicação inferior a 2,0. A taxa me-

Tabela 3. Sobrevivência (%) de brotações com e sem raízes visíveis de duas progênie de alcachofra em três substratos (S1= 100% H2; S2= 50% CAC + 50% H2; S3= 100% CAC), aos 30 dias de aclimatização em vasos plásticos {survival of shoots, with and without visible roots of two artichoke progenies, cultivated in three substrates (S1= 100% H2; S2= 50% CAC + 50% H2; S3= 100% CAC) at 30 days of acclimatization in plastic pots}. Passo Fundo, UPF, 2012.

Progênie	Substrato	Brotações com raízes	Brotações sem raízes	Total
P1 (B2L4R6)	S1	60	100	77,8
	S2	00	100	50,0
	S3	00	50	25,0
Média	-	21,4	84,6	50,9
P2 (B1L4R7)	S1	00	100	54,5
	S2	50	100	75,0
	S3	00	50	25,0
Média	-	15,4	85,7	51,5

H2= substrato comercial de marca Mecplant Horta 2 (commercial substrate Mecplant Horta 2); CAC= casca de arroz carbonizada (carbonized rice husk).

dia de multiplicação mencionada para a cv. Green Globe foi 3,7 (Lauzer & Vieth, 1990), para a cv. Early French foi de 3,0 (Brutti *et al.*, 2000) e para a Violet du Provence a taxa de multiplicação variou de 3 a 4,5 (Elia *et al.*, 2007).

O BAP tem sido a citocinina mais empregada na multiplicação *in vitro* de alcachofra por vários grupos (Lauzer & Vieth, 1990; Rossi & De Paoli, 1992; Iapichino, 1996; Fortunato *et al.*, 2005; Elia *et al.*, 2007; Bedini *et al.*, 2012.). Lauzer & Vieth (1990) demonstraram que o uso dessa citocinina nas concentrações de 0,5 a 1,0 mg/L combinado com 0,5 mg/L de ANA permitiu alcançar uma taxa de multiplicação de 5,0 para a cv. Green Globe. Segundo esses autores, o aumento da concentração de BAP elevou a taxa de multiplicação para 6,5 mas causou redução da altura das brotações. Esse mesmo comportamento foi observado por Brutti *et al.* (2000).

Grando *et al.* (2011) testaram várias combinações de BAP e ANA na multiplicação *in vitro* da cv. Nobre, constatando a maior taxa de multiplicação (4,1) no meio contendo 0,4 mg/L de BAP + 0,1 mg/L de ANA indicando que o balanço adequado de auxina:citocinina influencia a taxa de multiplicação.

El Boullani *et al.* (2012) relataram uma elevada taxa de multiplicação, 7,5 ao longo de 12 subcultivos, utilizando como explante brotos axilares oriundos

de plântulas germinadas *in vitro* do acesso de alcachofra Art 21 no meio MS suplementado com 1,0 mg/L de cinetina + 0,1 mg/L de ANA + 40,0 mg/L de sulfato de adenina. Segundo esses autores, essa alta taxa de multiplicação foi devido à remoção dos meristemas apicais e das folhas, durante os subcultivos, para estimular a formação de brotos axilares. Este procedimento não foi adotado no presente trabalho.

O número de folhas por broto não variou entre as duas progênie nos subcultivos I, II e III. Já no subcultivo IV os brotos da progênie P2 produziram o dobro do número de folhas/broto (45,4) da P1 (21,2) (Tabela 1).

Quanto à altura dos brotos, a progênie P2 foi superior a P1 somente no subcultivo III (Tabela 2). Em média, a altura dos brotos foi de 4,64 cm, variando de 3,50 cm a 5,66 cm entre os subcultivos, considerada adequada comparada aos relatos da literatura para essa espécie. Bedini *et al.* (2012) observaram, no oitavo subcultivo, uma variação de 3,81 a 6,19 cm entre quatro cultivares testadas.

A altura dos brotos obtidos *in vitro* na fase de multiplicação neste trabalho foi satisfatória quando comparada a outros relatos em alcachofra. Brutti *et al.* (2000) obtiveram brotos de 0,47 cm de altura da cv. Early French. Lauzer & Vieth (1990), utilizando a mesma combinação e concentração de reguladores

de crescimento deste trabalho (1,0 mg/L de BAP + 0,1 mg/L de ANA) obtiveram brotos da cv. Green Globe com 1,8 cm de altura. Elia *et al.* (2007) obtiveram brotações variando de 2,9 cm a 4,2 cm, dependendo do meio de multiplicação utilizado para a cv. Violet du Provence.

Pré-enraizamento e enraizamento

- Um total de 54 propágulos, 27 de cada progênie (P1 e P2), foi transferido para o meio de pré-enraizamento por 30 dias. Propágulos com altura média inicial de 3,5 cm cresceram 42%, apresentando, em média, 5,0 cm ao final de 30 dias. Observou-se também que as folhas se expandiram e se tornaram verde escuras ao final deste período.

A fase de pré-enraizamento é considerada uma etapa preparatória para o enraizamento, uma vez que, na ausência de citocinina (BAP) o propágulo reduz a produção de novos brotos axilares, o que permite seu alongamento e produção de folhas de tamanhos maiores, consistindo assim, em uma etapa importante dentro da micropropagação de alcachofra (Ancora, 1986). Esse procedimento foi utilizado por Fortunato *et al.* (2005), Grando *et al.* (2011) e Iapichino (2013) no enraizamento de outras cultivares de alcachofra.

Após 30 dias, os propágulos foram transferidos para meio de enraizamento por mais 30 dias. Verificou-se maior frequência de brotações enraizadas na progênie P1 (51,8%) comparado a P2 (14,%) (Figura 1d), evidenciando o efeito do genótipo no enraizamento (Tabela 2). O efeito do genótipo na capacidade de enraizamento foi relatado por Iapichino (2013) e por Bedini *et al.* (2012), onde o enraizamento de brotos variou de 0 a 42,5% em quatro cultivares de alcachofra.

Fortunato *et al.* (2005) obtiveram 86% de brotações enraizadas na cv. Catanese; Tavazza *et al.* (2004) 90% na cv. Spinoso Sardo; Grando *et al.* (2011) 62% de enraizamento na cv. Nobre, empregando 10,0 mg/L de AIA no meio de enraizamento. Estas diferenças podem refletir o efeito do genótipo e/ou das condições ambientais em que os experimentos foram conduzidos.

Apesar da progênie P2 apresentar baixa frequência de enraizamento

(14,8%), suas brotações formaram raízes mais longas (12,88 cm) e mais volumosas (2,3 cm³) comparadas às da progênie P1 (6,48 cm e 0,68 cm³) (Tabela 2). Neste experimento, devido à grande quantidade de raízes produzidas, optou-se pela avaliação do volume ao invés do número. O enraizamento *in vitro* é considerado uma das fases mais críticas da micropropagação de alcachofra (Rossi & De Paoli, 1992; Brutti *et al.*, 2000; Bedini *et al.*, 2012). Para contornar este problema várias estratégias têm sido empregadas, entre elas a redução de sais (Iapichino, 1996), a adição de ácido giberélico (GA₃) (Morzadec & Hourmant, 1997) e de componentes alternativos como as ciclodextrinas (Brutti *et al.*, 2000) ao meio de cultura.

Aclimatização - Os brotos que apresentavam raízes obtiveram menor taxa de sobrevivência do que os brotos não enraizados (Tabela 3). Isso foi observado principalmente na progênie P1. Como a progênie P2 produziu somente 4 brotos enraizados que foram divididos em três substratos, e 23 brotos sem raízes que também foram subdivididos em três substratos, não é possível fazer comparações entre a capacidade de aclimatização de brotos com e sem raízes para este genótipo. Os brotos contendo raízes da progênie P1 sobreviveram somente quando cultivados no substrato S1 e numa frequência de 60%. Por outro lado, o substrato S2 foi o único que permitiu a sobrevivência dos brotos enraizados de P2 (50%) (Tabela 3). Já os brotos sem raízes visíveis, de ambas as progênies, alcançaram 100% de sobrevivência nos substratos S1 e S2, e 50% no substrato S3.

Grando *et al.* (2011) constataram que aproximadamente 40% dos brotos de alcachofra que não desenvolveram raízes durante a fase de enraizamento, formaram essas estruturas durante a fase da aclimatização, sugerindo que, embora as raízes não fossem visíveis, elas foram induzidas durante a fase de enraizamento. O mesmo foi observado por Rossi & De Paoli (1992). No geral, considerando o comportamento dos brotos enraizados e não enraizados, a maior taxa de sobrevivência foi registrada no substrato S1 para a progênie P1 (77,8%)

e no substrato S2 para a progênie P2 (75,0%) (Tabela 3). Mesmo os brotos que não apresentaram raízes durante a primeira fase de aclimatização, estavam com raízes desenvolvidas e com boa sanidade ao final da aclimatização (Figuras 1e e 1f).

Neste trabalho foi relatado o estabelecimento de um protocolo eficiente para micropropagação de duas progênies pertencentes ao grupo Romanesco de alcachofra, utilizando como explante inicial nós cotiledonares de plântulas germinadas *in vitro*. Uma alta taxa de multiplicação (5,1) foi obtida em meio contendo 1,0 mg/L de BA + 0,1 mg/L de ANA ao longo de quatro subcultivos. Uma frequência de aclimatização acima de 75% nos substratos Mecplant Horta 2 100% e Mecplant Horta 2 50% e Casca de arroz carbonizada 50%.

REFERÊNCIAS

- ANCORA G. 1986. Globe artichoke (*Cynara scolymus*). In: BAJAJ YPS (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry Crops*. vol. 2 Crops I. Berlin: Springer Verlag. p. 471-484.
- ANCORA G; BELLI-DONINI ML; CUOZZO L. 1981. Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid *in vitro* micropropagation. *Scientia Horticulturae* 14: 207-213.
- ANCORA G; CRINÒ P; TAVAZZA R; PAGNOTTA MA; TEMPERINI O; CAMPANELLI R; SACCARDO F. 2012. The first three clones selected from the traditional artichoke 'Romanesco' populations and proposed for the release of new varieties. *Acta Horticulturae* 942: 125-131.
- BEDINI L; LUCCHESINI M; BERTOZZI F; GRAIFENBERG A. 2012. Plant tissue cultures from four Tuscan globe artichoke cultivars. *Central European Journal of Biology* 7: 680-689.
- BRUTTI C; APÓSTOLO NM; FERRAROTTI SA; LORENTE BE; KRYMKIEWICZ N. 2000. Micropropagation of *Cynara scolymus* employing cyclodextrins to promote rhizogenesis. *Scientia Horticulturae* 83: 1-10.
- CAMARGO FILHO WP; CAMARGO AMMP; CAMARGO FP. 2009. Mercado de alcachofra no Estado de São Paulo e viabilidade da produção orgânica. *Informações Econômicas* 39: 70-75.
- COINTRY EL; LÓPEZ ANIDO FS; GARCÍA SM; FIRPO IT. 1999. Mejoramiento genético del alcaucil (*Cynara scolymus*). *Avances en Horticultura* 4: 51-60.
- DIDONÉ SF. 2013. *Micropropagação de alcachofra a partir de plântulas germinadas in vitro*. Passo Fundo: UPF. 160p. (Dissertação mestrado).
- EL BOULLANI R; ELMOSLIH A; EL FINTI A; EL MOUSADIK A; SERGHINI, MA. 2012. Improved *in vitro* micropropagation of artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) *European Journal of Scientific Research* 80: 430-436.
- ELIA A; CONVERSA G; MONTERVINO C; LOTTI C. 2007. Micropropagation of the early artichoke cultivar 'Violet du Provence'. *Acta Horticulturae* 730: 127-134.
- FORTUNATO IM; RUTA C; CASTIGRANÒ A; SACCARDO F. 2005. The effect of mycorrhizal symbiosis on the development of micropropagated artichokes. *Scientia Horticulturae* 106: 472-483.
- GAMBORG OL; MILLER RA; OJIMA K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 150-158.
- GRANDO MF; AUGUSTIN L; SUZIN M; CALVETE EO; COMIN RC; COSTA AR; MORLIN B; DONIDA B. 2011. Micropropagation of globe artichoke 'Nobre-UPF', a Brazilian cultivar used for industrial purpose. *Acta Horticulturae* 923: 147-154.
- IAPICHINO G. 1996. Micropropagation of globe Artichoke (*Cynara scolymus*) from underground dormant buds (ovoli). *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 32: 249-252.
- IAPICHINO G. 2013. Micropropagation of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*). *Methods on Molecular Biology*, 11013: 369-380.
- IERNA A; MAURO RP; MAUROMICALE G. 2012. Improved yield and nutrient efficiency in two globe artichoke genotypes by balancing nitrogen and phosphorus supply. *Agronomy for Sustainable Development* 32: 773-780.
- LAUZER D; VIETH J. 1990. Micropropagation of seed-derived plants of *Cynara scolymus* cv. 'Green Globe'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21: 237-244.
- MAURO R; PORTIS EE; ACQUADRO A; LOMBARDO S; MAUROMICALE G; LANTERI S. 2009. Genetic diversity of globe artichoke landraces from Sicilian small-holdings: implications for evolution and domestication. *Conservation Genetics* 10: 431-440.
- MORZADEC JM; HOURMANT A. 1997. *In vitro* rooting improvement of globe artichoke (cv. Camus de Bretagne) by GA₃. *Scientia Horticulturae* 72: 59-62.
- NITSCH JP; NITSCH C. 1969. Haploid plants for pollen grains. *Science* 163: 85-87.
- PANDINO G; COURTS FL; LOMBARDO S; MAUROMICALE G; WILLIAMSON G. 2010. Caffeoylquinic acids and flavonoids in the immature inflorescence of globe artichoke, wild cardoon, and cultivated cardoon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 1026-1031.
- RAJANNA LN; SHARANABASAPPA G; SEETHARAM YN; ARAVIND B;

- MALLIKHARJUNA PB. 2011. *In vitro* regeneration of cotyledonary node explant of *Bauhinia racemosa*. *Botany Research International* 4: 75-80.
- REOLON-COSTA A. 2014. *Seleção recorrente fenotípica no melhoramento genético de alcachofra e caracterização molecular e química nos diferentes ciclos*. Passo Fundo: UPF. 171p. (Tese doutorado).
- ROSSI V; DE PAOLI G. 1992. Micropropagation of artichoke (*Cynara scolymus*). In: BAJAJ YPS (ed). *Biotechnology in agriculture and forestry: High-tech and micropropagation*. Berlin: Springer Verlag. p. 118-134.
- SINGH J; TIWARI KN. 2010. Evaluation of cotyledonary node of *Clitoria ternatea* for high frequency *in vitro* axillary shoot proliferation. *Asian Journal of Plant Sciences* 9: 351-357.
- TAVAZZA R; PAPACCHIOLI V; ANCORA G. 2004. An improved medium for *in vitro* propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*) cv. "Spinoso Sardo". *Acta Horticulturae* 660: 91-97.
- ZHANG H; PENGAND G; LUAN F. 2011. Efficient plant regeneration from cotyledonary node explants of *Cucumis melo*. *African Journal of Biotechnology* 10: 6757-6761.
-