

Tabla 2. Concentración de ACT y de Colina. Concentración de ACT expresada como $\mu\text{mol g}^{-1}$ de p.s. concentración de colina expresada como nmol g^{-1} de p.s.

	QAT		Choline		p.s.	
	$^A\text{NO}_3^-$	$^B\text{NH}_4^+$	$^A\text{NO}_3^-$	$^B\text{NH}_4^+$	$^A\text{NO}_3^-$	$^B\text{NH}_4^+$
10 °C ¹	3.81 ± 0.22	4.79 ± 0.24	4.31 ± 0.16	5.41 ± 0.15	1.17 ± 0.05	2.28 ± 0.3
25 °C ²	2.51 ± 0.19	2.86 ± 0.17	2.16 ± 0.13	2.17 ± 0.13	2.24 ± 0.03	3.51 ± 0.2
35 °C ³	13.07 ± 0.26	13.57 ± 0.28	10.17 ± 0.18	15.11 ± 0.17	0.88 ± 0.01	1.25 ± 0.1
Signif. ^{1,2,3}	***	***	***	***	***	***
Signif. ^{A,B,1}	*	*	*	*	*	*
Signif. ^{A,B,2}	ns	ns	ns	ns	*	*
Signif. ^{A,B,3}	ns	**	ns	ns	ns	ns

Resumiendo, cuando las plantas de tomate se desarrollan bajo condiciones de estrés térmico (35°C) acumulan ciertos solutos compatibles, tales como Pro, ACT y Colina, caracterizados por tener un alto contenido en N y por conferir a la planta tolerancia o resistencia a las condiciones de estrés ambiental (Chang y Lee, 1999). Por otro lado, un estrés térmico causado por temperaturas elevadas da lugar a una inhibición del crecimiento de las plantas, quizás como consecuencia de que el N esté siendo incorporado en su mayoría a estos compuestos con el fin de que, tras el cese del estrés térmico, la planta pueda potenciar su desarrollo mediante la degradación de estos compuestos ricos en nitrógeno y su incorporación en aminoácidos y proteínas del crecimiento y, de esta manera, garantizar su supervivencia. Finalmente, la nutrición de las plantas con NH_4^+ como fuente nitrogenada principal podría aumentar la acumulación de estos solutos favoreciendo la tolerancia de estas plantas a situaciones de estrés térmico, ya que este ión, por su toxicidad cuando es aplicado de forma única, es incorporado más rápida y eficazmente que el NO_3^- a estos solutos compatibles, como son la prolina y la colina.

REFERENCIAS.

- Bohnert H.J., Nelson D.E., Jensen R.G. (1995) *The Plant Cell* 7: 1099-1111.
- Bradford M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bryan JK (1990) In: *The biochemistry of plants: A comprehensive Treatise*, eds., Mifflin BJ and Lea PJ (Academic, San Diego) vol. 16, pp 161-195.
- Chang YC., Lee TM (1999). *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40: 289-294.
- Charest C., Phan C.T. (1990) *Physiol. Plant.* 80: 159-168.
- Chen THH., Murata N (2002) *Curr. Op. Plant Biol.* 5: 250-257.
- Geladopoulos TP., Sotiroudis TG., Evangelopoulos AE. (1991) *Anal. Biochem.* 192: 112-116.
- Grive CM., Gratton R. (1983) *Plant and Soil* 70: 303-307.
- Irigoyen JJ., Emerich DW., Sánchez-Díaz M. (1992) *Physiol. Plant.* 84: 55-60.
- Kavi Kishor P.B.K., Hong Z., Miao G.H., Hu C.A.A., Verma D.P.S. (1995) *Plant Physiol.* 108: 1387-1394.
- Kuo CG., Chen HM., Ma LH. (1986) *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111: 746-750.
- Kuznestov VV., Shevyakova NI (1997) *Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides.* 100: 320-326.
- Lin C.C., Kao C.H. (2001) *Plant Growth Regul.* 35: 69-74.
- Madan S., Nainawatee H.S., Jain R.K., Chowdhury J.B. (1995) *Ann. Bot.* 76: 51-57.
- Maroto J.V. (1995). *Horticultura herbácea especial*, 4ª ed, rev y ampl., ISBN: 84-7114-495-6, Madrid, Mundiprensa, pp 714-775.
- Naidu BP., Paleg LG., Aspinall D., Jennings AC., Jones GP (1991) *Phytochem.* 30: 407-409.
- Paquin R., Lechasseur P. (1979) *Can. J. Bot.* 57: 1851-1854.
- Rathinasabapathi B., Sigua C., Ho J., Gage D.A. (2000) *Physiol. Plant.* 109: 225-231.
- Raymond P., Brouquisse R., Chevalier C., Couee I., Dieuaidé M., James F., Just D., Pradet A. (1994) In: *Biochemical and cellular mechanisms of stress tolerance in plants.* Pp 325-334. Springer-Verlag, Berlin.
- Rivero RM, Sánchez E., García PC., López-Lefebvre, Ruiz JM, Romero L (2001) *Plant Science* 160: 315-321
- Rivero RM., Sánchez E., García PC., López-Lefebvre, Ruiz JM, Romero L (2002) *Func. Plant Biol.* 29: 643-648.
- Schober B., Tschesche H. (1978) *Biochim. Biophys Acta* 541: 270-277.
- Sese ML, Shono M., Tobita S (1999) *Photosynth.* 36: 557-563.
- Van Zinderen, E.M., (1986). *Annual Conference on Hydroponics*, Hydroponics Society of America, Concord, CA, pp 371-372.
- Veschambre D., Zuang H. (1979). *Pép. Hort. Mar.* 202: 13-21.
- Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowls R.D., Somero G.N. (1982) *Science* 217: 1214-1222.
- Zhang CS., Lu Q., Verma DPS. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 20491-20496

AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À CLOROSE FÉRRICA DE PORTA-ENXERTOS DE CITRINOS EM SOLUÇÃO NUTRITIVA

Maribela Pestana¹, Amarilis de Varennes², Javier Abadía³, and Eugénio Araújo Faria¹

¹ Universidade do Algarve, FERN, Campus de Gambelas, 8000-117 Faro – Portugal. ² Instituto Superior de Agronomia, DQAA, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa – Portugal. ³ Departamento de Nutrición Vegetal, EEAD-CSIC, Apartado 202, 50080 Zaragoza - España

INTRODUÇÃO

Um dos principais factores indutores da clorose férrica em solos calcários é o ião bicarbonato cuja acção parece afectar diversos processos metabólicos nas raízes e nas folhas, diminuindo a disponibilidade de Fe no interior da planta. Nestas condições, quando a absorção de Fe é baixa, os genótipos Fe-eficientes desencadeiam mecanismos de resposta ao nível da parte aérea e/ou radicular que incluem alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas (Schmidt, 1999). Ao nível da parte aérea, o ferro é um elemento essencial para a formação das membranas dos tilacóides e para a biossíntese de clorofila (Abadía, 1992). Consequentemente, a eficiência de conversão da energia fotossintética é afectada pela clorose férrica e pode ser avaliada pelos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (Abadía *et al.*, 1999). Neste ensaio em solução nutritiva pretendeu-se caracterizar a tolerância de três porta-enxertos de citrinos à clorose férrica com base em diversos parâmetros e processos fisiológicos da planta.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio realizou-se numa estufa de vidro com ambiente controlado. Os porta-enxertos de citrinos utilizados foram o *Citrus taiwanica* Tan., a citranjeira ‘Troyer’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) e o citrumeleiro ‘Swingle’ (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus paradisi* Macf.). A solução nutritiva apresentava a seguinte composição química (em mM): 5,0 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1,4 KNO_3 , 0,6 K_2SO_4 , 1,0 MgSO_4 , 0,9 NaCl , 0,6 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3,0 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 MgCl_2 e (em μM): 41,8 H_3BO_3 , 3,8 ZnSO_4 , 3,9 CuSO_4 , 6,9 MnSO_4 e 1,0 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (Carpena-Artes, 1983). Estabeleceram-se 5 modalidades correspondentes a 5 concentrações de ferro (na forma de $\text{Fe}(\text{III})\text{-NaEDTA}$) na solução nutritiva (0, 5, 10, 15 e 20 μM de Fe) todas na presença de CaCO_3 . Com a adição de carbonato de cálcio à solução nutritiva (1 g de CaCO_3 por litro de solução nutritiva) pretendeu-se simular condições semelhantes às dos solos calcários de forma a induzir a clorose férrica. O grau de clorose foi estimado através da utilização de um aparelho medidor de clorofila, SPAD-502 (Minolta Co., Osaka, Japão). De forma a converter os valores de SPAD na correspondente concentração de clorofila total efectuou-se, previamente, uma curva de calibração para cada uma das espécies estudadas. Os valores de SPAD (X) foram convertidos em μmol de clorofila total m^{-2} (Y) através das curvas de calibração para citranjeira ‘Troyer’ ($Y=0.1X^2 + 2.9X - 14.2$; $R^2= 0.97$; $n=25$; $p<0.001$), *Citrus taiwanica* ($Y=-0.08X^2 + 14.9X - 94.2$; $R^2= 0.93$; $n=20$; $p<0.001$) e citrumeleiro ‘Swingle’ ($Y=0.1X^2 + 2.2X + 4.3$; $R^2= 0.97$; $n=30$; $p<0.001$). Realizaram-se 2 medições semanais de SPAD nas 2ª e 3ª folhas recentemente expandidas em cada uma das 10 plantas amostradas por modalidade. A percentagem (%) de variação da clorofila total entre o início e o final do ensaio foi utilizada para comparar os 3 porta-enxertos. No final do ensaio, os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (F_o , fluorescência basal; F_m , fluorescência máxima; $F_v = F_m - F_o$, fluorescência variável) foram medidos através do fluorímetro portátil (PEA - Plant Efficiency Analyser). No final do ensaio foi ainda calculada a razão entre peso seco da parte radicular e da aérea (RRPA) e analisada a composição mineral de cada uma destas partes conforme descrito por Pestana *et al.* (2001). A análise estatística dos dados foi processada através do programa SAS (SAS Institute, 1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O investimento dos diferentes porta-enxertos na biomassa da parte aérea ou da parte radicular, expresso pela razão entre a parte radicular e a parte aérea (RRPA), foi diferente consoante a concentração de ferro na solução nutritiva (Figura 1). As plantas dos porta-enxertos citranjeira ‘Troyer’ e *C. taiwanica* que cresceram sem Fe apresentaram valores de RRPA mais elevados que as plantas verdes, demonstrando o

efeito da clorose fêrrica no aumento da biomassa radicular, preferencialmente à da parte aérea, tal como obtido por diversos autores em outras fruteiras. Segundo Bavaresco *et al.* (1994), este facto pode ser motivado pela activação de mecanismos de resposta, como o aumento do número de raízes secundárias e a diferenciação de células de transferência nos ápices radiculares, os quais são genotipicamente determinados e estão associados a espécies mais tolerantes à clorose fêrrica. Deste modo, o porta-enxerto 'Swingle' não evidenciou este mecanismo de resposta traduzido por valores de RRPA constantes e independentes da concentração de ferro na solução nutritiva e poderá ser considerado como susceptível à clorose fêrrica.

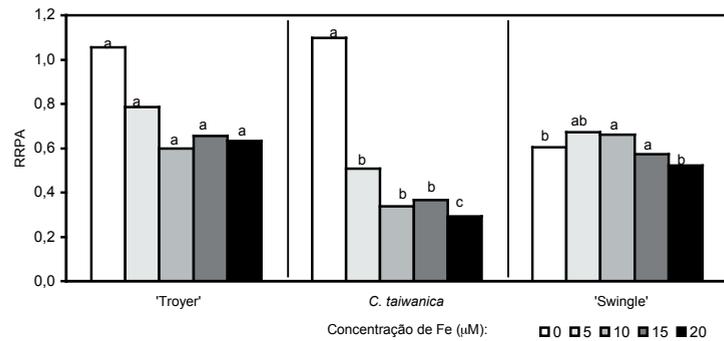


Figura 1. Razão entre a parte radicular e a aérea (RRPA) para cada porta-enxerto. Para cada concentração de Fe, colunas com a mesma letra não indicam diferenças significativas a 95% (teste Duncan).

A percentagem (%) de variação da clorofila total ocorrida entre o princípio e o final do ensaio está apresentada na Figura 2. Enquanto que os porta-enxertos 'Troyer' e *Citrus taiwanica* apresentaram um decréscimo de clorofila total em relação ao valor original apenas nas concentrações mais baixas de Fe (0 e 5 µM de Fe), o porta-enxerto 'Swingle' mostrou sempre variações negativas com excepção dos valores referentes à concentração mais alta de ferro (20 µM Fe).

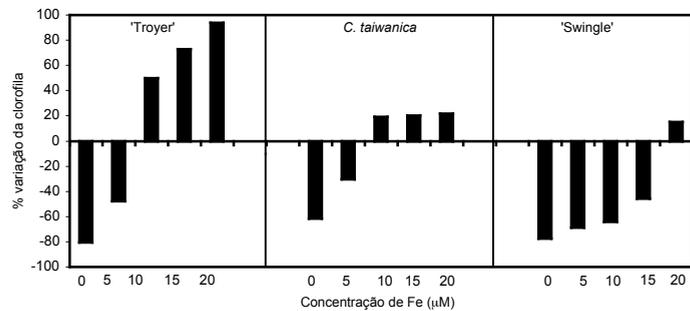


Figura 2. Percentagem de variação da clorofila total entre o início (0 %) e o final do ensaio para cada um dos porta-enxertos.

Nas restantes modalidades (10, 15 e 20 µM de Fe), os porta-enxertos 'Troyer' e *C. taiwanica*, apresentaram comportamentos diferentes. Enquanto que para o 'Troyer' a percentagem de variação da clorofila total relacionou-se directamente com a quantidade de Fe adicionada à solução nutritiva, no *C. taiwanica* a partir da modalidade com 10 µM de Fe os acréscimos de clorofila foram idênticos entre si e independentes da concentração de ferro na solução nutritiva. O 'Troyer' foi o porta-enxerto que apresentou, independentemente da modalidade, maiores percentagens de variação da clorofila total. Estes resultados reflectem a diferente capacidade de resposta, de cada um dos porta-enxertos, ao efeito inibitório do ião bicarbonato na absorção e translocação do ferro nas plantas superiores.

Nas diferentes abordagens aos mecanismos de susceptibilidade à clorose fêrrica o aumento ou a redução da biomassa parece estar relacionada com a eficiência de conversão da energia captada pelo aparelho

fotossintético (dados não apresentados). Os baixos valores da razão F_v/F_m observados nas plantas cloróticas dos porta-enxertos 'Troyer' e *C. taiwanica*, significam que a eficiência de conversão da energia fotossintética foi significativamente afectada pela clorose fêrrica (Morales *et al.*, 1998). Na citranjeira 'Troyer' esta redução foi devida apenas a alterações ao nível do transporte de electrões, expressa pela diminuição da F_m (83%), enquanto que no *C. taiwanica* se deveu também a alterações estruturais ao nível dos pigmentos do PSII uma vez que a F_o também variou (56%). Os acréscimos verificados na F_o podem ser originados pela redução da plastoquinona ocorrida no escuro, como verificado por Belkhdja *et al.* (1998) em beterraba sacarina. Parte da variação da fluorescência pode ser também explicada pelo efeito da clorose fêrrica na clorofila total; para o porta-enxerto 'Troyer' a percentagem de variação da razão F_v/F_m explicada pela clorofila total foi de aproximadamente 59% e para o *Citrus taiwanica* de 76%.

Comparativamente com os outros porta-enxertos, a translocação do Fe no citrumeleiro 'Swingle' foi mais afectada pelo ião bicarbonato uma vez que o Fe se acumulou preferencialmente na raiz (razão $F_{ep}/F_{er} < 1$), tal como obtido por Cinelli (1995). Existe uma grande discrepância de resultados na utilização das razões nutritivas como forma de caracterização e selecção de diferentes espécies vegetais quanto à sua tolerância à clorose fêrrica provavelmente devido ao material vegetal em estudo e às condições de cultura. As relações obtidas entre o grau de clorose, expresso pela clorofila total, e o equilíbrio nutritivo da parte aérea traduzido por razões entre o teor de alguns nutrientes, estão apresentadas na Figura 3 para cada um dos porta-enxertos. Da análise da figura salienta-se que os valores de clorofila total obtidos para as diferentes concentrações de Fe na solução nutritiva correlacionaram-se de modo diferente com o equilíbrio nutritivo da parte aérea de cada um dos porta-enxertos.

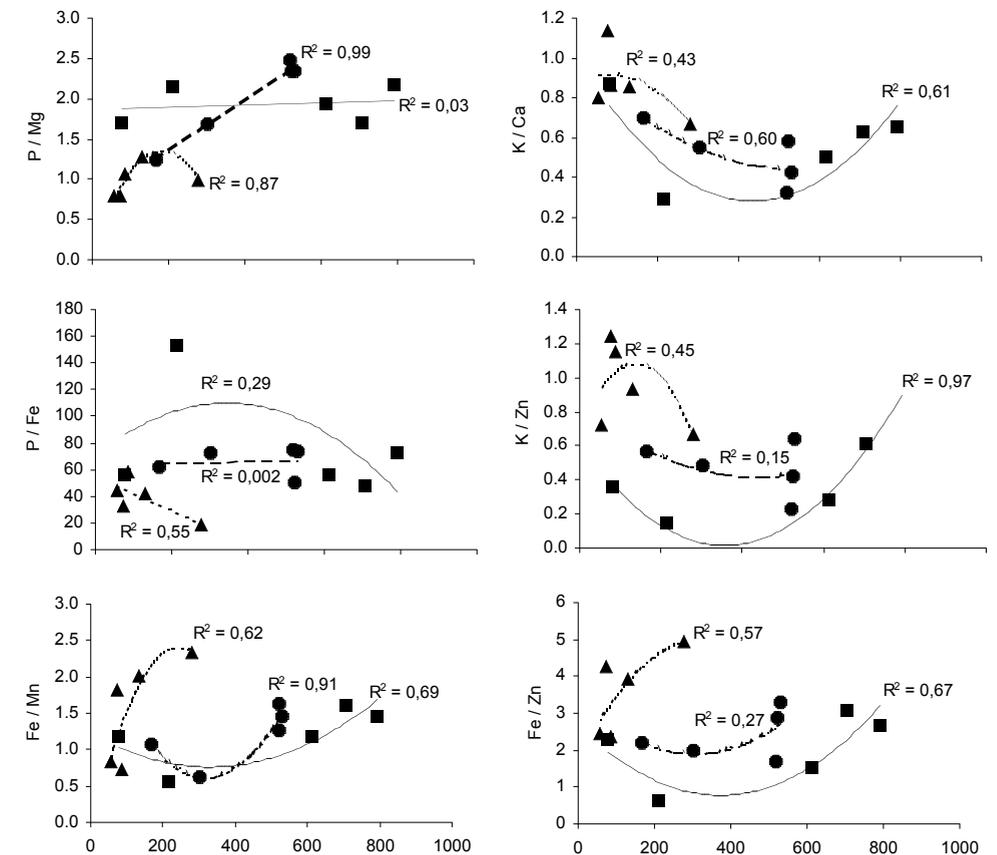


Figura 3. Correlações entre as razões nutritivas (P/Mg, K/Ca, P/Fe, K/Zn, Fe/Mn e Fe/Zn) e a clorofila total (eixo xx', µmol m⁻²) em cada um dos porta-enxertos obtida no final do ensaio: citranjeira 'Troyer' (■, —), *Citrus taiwanica* (●, ----) e citrumeleiro 'Swingle' (▲,).

A razão P/Mg foi a que se correlacionou melhor com a clorofila total para o porta-enxerto *C. taiwanica*, enquanto que para o 'Troyer' foi a razão K/Zn e para o 'Swingle' a razão Fe/Mn. A razão Fe/Mn foi a que apresentou relações mais significativas com a clorofila total, nos três porta-enxertos indicando ser um bom parâmetro para avaliar a tolerância à clorose férrica.

É possível concluir que, relativamente aos porta-enxertos estudados, a citranjeira 'Troyer' é o mais tolerante, seguido do *Citrus taiwanica* e apresentando-se o citrumeleiro 'Swingle' como o mais sensível à clorose férrica. Esta classificação está de um modo geral de acordo com a apresentada por Byrne *et al.* (1995), baseada em parâmetros medidos na parte aérea, onde a citranjeira 'Troyer' e o *Citrus taiwanica* situam-se no mesmo grupo, o dos porta-enxertos medianamente tolerantes. Com os resultados obtidos neste ensaio a nível radicular foi possível distinguir o comportamento dos dois porta-enxertos salientando-se a maior tolerância do 'Troyer' relativamente ao *C. taiwanica*. A utilização de diferentes concentrações de Fe na solução nutritiva permitiu ainda identificar o nível crítico de Fe de cada um dos porta-enxertos estudados, isto é o valor a partir do qual a disponibilidade de Fe na rizosfera é suficiente para contrariar os efeitos do ião bicarbonato, evitando o aparecimento de sintomas de clorose férrica. Esses valores são de 10, 15 e 20 µM de Fe respectivamente para a citranjeira 'Troyer', o *C. taiwanica* e o citrumeleiro 'Swingle'. A citranjeira 'Troyer', considerada como o porta-enxerto mais tolerante apresentou maior crescimento da parte aérea, maior acumulação de biomassa, valores de clorofila total mais elevados, uma eficiência fotoquímica superior e um equilíbrio nutritivo menos afectado pela clorose férrica. A susceptibilidade do 'Swingle' está essencialmente associada à necessidade de mais Fe na solução nutritiva, para conseguir contrariar os efeitos do ião bicarbonato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadía, J. 1992. Leaf responses to iron deficiency: A review. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1699-1713.
- Abadía, J.; Morales, F.; Abadía, A. 1999. Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant and Soil*, 215:183-192.
- Bavaresco, L.; Fregoni, M.; Perino, A. 1994. Physiological aspects of lime-induced chlorosis in some *Vitis* species. I. Pot trial on calcareous soil. *Vitis*, 33:123-126.
- Belkhdja, R.; Morales, F.; Quílez, R.; López-Millán, A.F.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998. Iron deficiency causes changes in chlorophyll fluorescence due to the reduction in the dark of the photosystem II acceptor side. *Photosynthesis Research*, 56:265-276.
- Bialczyk, J. e Lechowski, Z. 1992. Absorption of HCO₃⁻ by roots and its effect on carbon metabolism of tomato. *Journal of Plant Nutrition*, 15(3):293-312.
- Byrne, D.H.; Rouse, R.E.; Sudahomo, M. 1995. Tolerance to citrus rootstocks to lime-induced iron chlorosis. *Subtropical Plant Science*, 47:7-11.
- Cinelli, F. 1995. Physiological responses of clonal quince rootstocks to iron-deficiency induced by addition of bicarbonate to nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition*, 18(1):77-89.
- Morales, F.; Grasa, R.; Abadía, A.; Abadía, J. 1998. Iron chlorosis paradox in fruit trees. *Journal of Plant Nutrition*, 21(4):815-825.
- Pestana, M.; David, M.; Varennes, A. de; Abadía, J.; Faria, E.A. 2001. Responses of 'Newhall' orange trees to iron deficiency in hydroponics: effects on leaf chlorophyll, photosynthetic efficiency and root ferric chelate reductase activity. *Journal of Plant Nutrition*, 24(10):1609-1620.
- SAS Institute. 1989. SAS/STAT User's Guide. 6ª Versão. Vol. 1 e 2, SAS Institute Inc., Cary, EUA
- Schmidt, W. 1999. Review. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist*, 141:1-26.

OPTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA O ENRAIZAMENTO DE REBENTOS MICROPROPAGADOS DE ALFARROBEIRA COM BASE NA CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES DAS FOLHAS

A. Romano, S. Gonçalves & P.J. Correia

Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8000-117 Faro, Portugal

RESUMO

Foram efectuados ensaios no sentido de otimizar as concentrações de macronutrientes do meio de cultura de enraizamento in vitro de rebentos micropropagados de alfarrobeira (*Ceratonia siliqua* L.). Foi utilizado o protocolo de enraizamento proposto por Romano *et al.* (2002), tendo sido testados os meios de cultura GD e MS e duas modificações a partir do meio MS: 1/2MS, 1/2MS+Ntotal. Os resultados obtidos mostram que a utilização de meios de cultura menos concentrados em sais como 1/2MS e GD, conduziram à obtenção de frequências de enraizamento mais elevadas, respectivamente 80% e 85% de rebentos enraizados. Não se observaram diferenças significativas relativamente ao número médio de raízes desenvolvidas e tamanho da raiz mais longa. A percentagem de sobrevivência observada não foi influenciada pelo meio de enraizamento. As proporções dos elementos fornecidos ao meio de cultura são distintas das calculadas com base nos teores foliares de árvores adultas registados durante um ensaio de rega e fertilização durante três anos. Estas diferenças são particularmente evidentes para o K, P e Ca.

INTRODUÇÃO

As condições de cultura são determinantes para o desenvolvimento das culturas in vitro. O meio nutritivo terá de conter todas as substâncias necessárias ao crescimento das culturas, tais como: nutrientes inorgânicos, fontes de carbono, vitaminas, reguladores de crescimento e outros aditivos, em solução aquosa ou gelificada. Os nutrientes inorgânicos consistem em sais minerais que satisfazem as necessidades em macro e micronutrientes necessários para o crescimento das culturas.

Diferentes meios de cultura foram descritos ao longo das últimas décadas, no entanto o meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com ou sem modificações, continua a ser o meio mais utilizado na cultura in vitro de espécies lenhosas. A maioria dos meios têm sido desenvolvidos por tentativa e erro. Em alguns casos têm sido usados métodos menos empíricos. O conteúdo mineral do meio MS foi formulado com base na análise de tecidos de tabaco incinerados. Recentemente, Terrer e Tomás (2001) basearam as formulações dos meios de cultura in vitro de híbridos de pessegueiro x amendoeira, nas concentrações dos nutrientes das folhas de árvores adultas.

A iniciação radicular é um fenómeno morfogenético complexo que envolve profundas modificações metabólicas e que está sujeito à interacção de vários factores (De Klerk *et al.*, 1999). Meios de cultura muito concentrados em sais, como o meio de MS, têm-se revelado desfavoráveis para o enraizamento de lenhosas, sendo normalmente preferidas diluições deste meio ou meios menos concentrados (Bonga & von Aderkas, 1992).

Apesar da alfarrobeira ser geralmente descrita como uma espécie difícil de enraizar, a propagação vegetativa é possível por estacaria (Alorda *et al.*, 1987) e enxertia (Medrano *et al.*, 1987). No entanto, estas técnicas restringem a propagação em larga escala uma vez que o material vegetal obtido a partir de árvores seleccionadas é limitado. Por outro lado, a alfarrobeira apresenta uma variabilidade genética muito grande, o que torna difícil perpetuar características desejáveis pelos métodos convencionais de melhoramento (Battle & Tous, 1997). A propagação in vitro desta espécie apresenta-se como uma potencial alternativa aos métodos tradicionais de propagação (Romano *et al.*, 2002). No seguimento de estudos anteriores com esta espécie, foi objectivo deste estudo comparar a composição de macronutrientes em diferentes meios de cultura, com a concentração desses nutrientes nas folhas de árvores adultas em diferentes épocas do ano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Nos ensaios de enraizamento utilizaram-se rebentos com 3 cm de comprimento, seleccionados a partir de culturas da cv. 'Mulata' em multiplicação em meio MS suplementado com 2.2 µM de BA (Romano *et al.*, 2002). Foram testados quatro meios de cultura para expressão e desenvolvimento radicular: MS, 1/2MS