

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**CONTRIBUIÇÕES PARA A MICROPROPAGAÇÃO DE
Peltophorum dubium (SPRENGEL) TAUBERT**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline Ritter Curti

Santa Maria, RS, Brasil

2011

CONTRIBUIÇÕES PARA A MICROPROPAGAÇÃO DE
***Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT**

Aline Ritter Curti

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lia Rejane Silveira Reiniger

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**CONTRIBUIÇÕES PARA A MICROPROPAGAÇÃO DE
Peltophorum dubium (SPRENGEL) TAUBERT**

elaborada por
Aline Ritter Curti

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA:

Lia Rejane Silveira Reiniger, Dr^a.
(Presidente/Orientador)


Leandro Vieira Astarita, Dr. (PUCRS)

Marlove Fátima Brião Muniz, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2011

C978m Curti, Aline Ritter
Multiplicação e enraizamento in vitro de *Peltophorum dubium* (Sprengel)
Taubert / por Aline Ritter Curti. – 2011.
94 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Lia Rejane Silveira Reinger
Coorientador: Marlove Fátima Brião Muniz
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de
Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2011

1 .Engenharia florestal 2. Auxinas 3. Citocininas 4. Nós cotiledonares
5. Tratamento “pulse” 6. Substratos alternativos I. Reinger, Lia Rejane
Silveira
II. Muniz, Marlove Fátima Brião III. Título.

CDU 630.1

Ficha catalográfica elaborada por Denise Barbosa dos Santos – CRB 10/1756
Biblioteca Central UFSM
Revisão de Português: Melissa Heberle

©2011

Todos os direitos autorais reservados a Aline Ritter Curti. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.
Endereço: Av. Roraima, nº 1000, CEU III, 5113, Santa Maria, RS, Brasil, CEP: 97105-970;
Celular: 55 9920 2860;
Endereço Eletrônico: alinerittercurti@yahoo.com.br

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Artemio e Nerci Curti, por nunca terem
medido esforços para que meu sonho
se tornasse realidade e por todo o
amor a mim dedicado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos que tenho recebido.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo incentivo e pela compreensão nos momentos em que não pude estar com eles.

Ao meu irmão e sua família por sempre me receberem em tantas idas e vindas e pelo exemplo de perseverança que representam para mim.

Aos meus avós, Kurt e Elga Ritter (*in memoriam*), pelo exemplo de amor, dedicação e lealdade que muito contribuíram para o meu caráter, e são motivo de orgulho para mim.

Ao Chico, por seu amor e carinho que tornaram os meus dias mais alegres, por estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis; pela compreensão quando nem eu mesmo me suportava e por sempre lembrar que tudo iria dar certo.

À minha orientadora, professora Dr^a Lia Rejane Silveira Reiniger, por tantas oportunidades oferecidas para meu crescimento tanto profissional quanto pessoal; por todo o aprendizado que me proporcionou; por trabalhar incansavelmente para que nossos objetivos fossem alcançados; pelo exemplo de mulher firme e batalhadora que, mesmo nas situações mais adversas, sempre esteve presente e, principalmente, pela amizade e confiança em mim depositadas.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal pela minha formação e pelas oportunidades.

À CAPES, pela bolsa concedida, que viabilizou a execução deste trabalho.

Ao colega Diego Pascoal Golle por ter me privilegiado com seus ensinamentos e dicas, pelo exemplo de dedicação e profissionalismo e também por sua amizade.

À colega Aline Paim pela amizade de tantos anos, pela ajuda na execução dos experimentos e por tornar a nossa rotina de laboratório mais divertida e mais colorida. Ao colega Navroski, por sua ajuda prestada nas atividades de laboratório e nos estudos e pela amizade.

Aos demais colegas de laboratório, Iana, Enrique, Carol, Mari, Marta e Ludmila, pela ajuda quando necessária e pela convivência e amizade.

Às minhas colegas de apartamento Cris e Síndia pela amizade e por tantos fins de tarde e de noite regados a uma boa pipoca com chimarrão, que fizeram com que chegar em casa no fim do dia fosse mais prazeroso.

À Tita, secretária do PPGEF, pela ajuda e esclarecimentos prestados.

A todos que de alguma maneira contribuíram para que essa caminhada pudesse ser concluída.

Muito obrigada!

“Nunca deixe que lhe digam
Que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos
Nunca vão dar certo
Ou que você nunca
Vai ser alguém...”

(Renato Russo, Flavio Venturini)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

CONTRIBUIÇÕES PARA A MICROPROPAGAÇÃO DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

AUTORA: ALINE RITTER CURTI

ORIENTADORA: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de fevereiro 2011.

Peltophorum dubium (Sprengel) Taubert é uma espécie florestal nativa de rápido crescimento e dotada de importância ambiental e econômica. No entanto, os estudos relacionados à produção de mudas de qualidade por meio da propagação vegetativa são, ainda, incipientes. Em virtude disso, este trabalho objetivou estudar metodologias para a multiplicação e para a formação de raízes *in vitro* de *Peltophorum dubium*. Para a multiplicação foram avaliados o emprego isolado ou combinado das citocininas 6-Benzilaminopurina (BAP), Cinetina (CIN), Isopenteniladenina (2iP) e Thidiazuron (TDZ) em diferentes concentrações, bem como sua associação com a auxina Ácido alfa-Naftaleno Acético (ANA) ou carvão ativado. Na formação de raízes foram avaliadas as auxinas ANA, Ácido 3-Indol Butírico (AIB) e Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) em diferentes concentrações, bem como o período de exposição das brotações a esses fitorreguladores e seu cultivo nos meios nutritivos MS e WPM. Foram avaliados, ainda, substratos alternativos (vermiculita, Plantmax® ou areia fina) associados a diferentes volumes de meio nutritivo MS, contendo ou não ágar, na formação *in vitro* de raízes, com o intuito de oferecer um meio mais poroso para o desenvolvimento do sistema radicular. Não ocorreu emissão de brotações adventícias na ausência de citocininas em epicótilos de *Peltophorum dubium*. TDZ e 2iP, a 5 ou 10 μM , associados a 0,015 μM de ANA, em meio MS, promoveram as maiores porcentagens de brotações adventícias. No entanto, as brotações apresentaram pequeno desenvolvimento, intensa formação de calos na base e clorose foliar, o que inviabilizou a sua utilização. Na ausência de citocininas não ocorreu clorose foliar. A inclusão de 1 g L⁻¹ de carvão ativado ao meio nutritivo MS proporcionou a obtenção de brotações mais vigorosas e a utilização de epicótilos contendo nós cotiledonares permitiu a formação de novas brotações em todos os tratamentos testados. Quando BAP foi utilizado isoladamente não foi observada a emissão de brotações adventícias em epicótilos; estas só passaram a ocorrer quando foram utilizadas combinações de BAP com CIN ou 2iP. Em meio nutritivo MS, a maior formação de calos foi observada na presença de 10 μM de AIB, aos 30 dias. Em meio nutritivo WPM, a maior formação de calos ocorreu na ausência de AIB. Reduzidas porcentagens de formação de raízes em brotações de *Peltophorum dubium* foram obtidas tanto em meio MS como em WPM, independentemente da ausência ou da presença de AIB. Em meio nutritivo MS, independente da presença ou não de auxinas e, independente da concentração utilizada, ocorreu calogênese na base das brotações de *Peltophorum dubium* aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Tanto o meio nutritivo MS quanto o WPM possibilitaram a formação de raízes em brotações de *Peltophorum dubium* com a utilização de tratamentos “pulse” de AIB, em concentrações entre 0 e

20 μM , durante seis dias no meio nutritivo. No entanto, a formação de raízes não foi satisfatória. Ocorreu intensa formação de calos na base das brotações, aos 60 dias, quando a vermiculita foi utilizada como substrato no processo de indução ao enraizamento. Aos 60 dias foi possível obter formação de raízes em todos os substratos testados. A combinação de meio MS acrescido de 10 μM de AIB + vermiculita + ágar proporcionou 36,8% de formação de raízes nas brotações, bem como melhorou a qualidade do sistema radicular de *Peltophorum dubium*. A utilização de epicótilos contendo nós cotiledonares, em meio nutritivo MS, acrescido de carvão ativado, reduz a calogênese na base dos explantes e eleva a emissão de brotações adventícias para 75%, bem como proporciona a obtenção de brotações mais vigorosas e sem clorose foliar. As auxinas ANA, AIB e 2,4-D, em concentrações de até 20 μM durante todo o período de cultivo não são eficientes em promover a formação *in vitro* de raízes em brotações de *Peltophorum dubium*. O emprego de tratamento “pulse” com AIB por seis dias e a redução na concentração de sais do meio nutritivo após esse período permite a formação de raízes, independente da concentração de AIB e da utilização dos meios MS ou WPM. Resultados mais promissores são obtidos com a utilização da combinação de vermiculita, meio nutritivo e ágar, tanto na porcentagem de formação de raízes, como na qualidade do sistema radicular formado.

Palavras-chave: Auxinas. Citocininas. Epicótilos. Tratamento “pulse”. Substratos alternativos.

ABSTRACT

Master Degree Dissertation
Post-Graduation Course in Forest Engineering
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

CONTRIBUTIONS TO THE MICROPROPAGATION *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

AUTHOR: ALINE RITTER CURTI

ADVISOR: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Date and Place of Defense: Santa Maria, RS, February 28, 2011

Peltophorum dubium (Sprengel) Taubert is a native forest species that shows fast development with environmental and economic importance. However, studies related to the production of quality seedlings by vegetative propagation are still incipient. As a result, this study investigated methods for multiplication and *in vitro* root formation of *Peltophorum dubium*. For multiplication was evaluated the use, alone or combined, of the cytokinins 6-Benzylaminopurine (BAP), Kinetin (KIN), isopentenyladenine (2iP) and Thidiazuron (TDZ) in different concentrations and its association with the auxin alpha-naphthalene acetic acid (ANA) or activated charcoal. In the formation of roots were evaluated the auxins NAA, indole-3-butyric acid (IBA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at different concentrations and the exposure time of shoots to these growth regulators and their cultivation in nutrient media MS and WPM. We evaluated also alternative substrates (vermiculite, Plantmax ® or fine sand) associated with different volumes of MS nutrient medium containing agar or not, in the *in vitro* root formation, with the aim of providing a more porous medium to the development of root system. There wasn't emission of adventitious shoots in the absence of cytokinins in epicotyls of *Peltophorum dubium*. TDZ and 2iP, at 5 or 10 µM, associated with 0.015 µM NAA in MS medium promoted the highest percentage of buds. However, the shoots showed little development, intensive formation of callus at the base and leaf chlorosis, which didn't permit its use. In the absence of cytokinin was not observed leaf chlorosis. The inclusion of 1 g L⁻¹ of activated charcoal to the nutrient medium MS provided more vigorous shoots and the use of epicotyl containing cotyledonary nodes allowed the formation of new shoots in all treatments. When BAP was used alone was not observed the emission of adventitious buds on epicotyl; these only started to occur when we used combinations of BAP with KIN or 2iP. In MS nutrient medium, the highest callus formation was observed in the presence of 10 µM IBA, after 30 days. In nutrient medium WPM, the highest callus formation occurred in the absence of IBA. Reduced percentage of root formation in *Peltophorum dubium* shoots were both obtained in MS medium as in WPM, regardless of the absence or presence of IBA. In MS nutrient medium, regardless of the presence or absence of auxin and independent of the concentration of this class of growth regulators, callus formation occurred at the base of the shoots of *Peltophorum dubium* to 30 days *in vitro* culture. Both the nutrient media MS and WPM possibilite the formation of roots on shoots of *Peltophorum dubium* with the use of "pulse" treatments of IBA at concentrations between 0 and 20 µM for six days in nutrient medium. However, the root formation was not satisfactory. There was intense callus formation at the base of the shoots at

60 days of culture, when the vermiculite was used as substrate in the process of inducing rooting. At 60 days it was possible to obtain root formation on all substrates. The combination of MS medium supplemented with 10 μ M IBA, vermiculite and agar provided 36.8% of root formation in shoots, as well as improved the quality of roots of *Peltophorum dubium*. The use of epicotyl containing cotyledonary nodes on MS nutrient medium, supplemented with activated charcoal reduces the callus at the base of the explants and raises the emission of adventitious shoots for 75% and provides the obtaining of more vigorous shoots and leaves without chlorosis. The auxins NAA, IBA and 2,4-D in concentrations of up to 20 μ M during the whole period of culture are not efficient in promoting the *in vitro* formation of roots on shoots of *Peltophorum dubium*. The use of pulse treatment with IBA for six days and the reduction the concentration of salts from the nutrient medium after this period allows the formation of roots, independent of IBA concentration and use of MS or WPM media. Most promising results are obtained using the combination of vermiculite, nutrient medium and agar, both in percentage of root formation, and the quality of root system formed.

Keywords: Auxins. Cytokinins. Cotyledonary nodes. Pulse treatment. Alternative substrates.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fonte de explantes e tipos de explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert utilizados nos experimentos de multiplicação *in vitro*. A) Plântula germinada *in vitro*, aos 30 dias, com detalhe indicando o epicótilo; B) Cortes realizados para isolamento do epicótilo com o nó cotiledonar e C) Epicótilo contendo o nó cotiledonar. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 37
- Figura 2 - Aspecto das brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, após 30 dias de cultivo *in vitro* de epicótilos em meio nutritivo MS suplementado com 0,015 μ M de ANA na ausência de citocininas (A) e na presença de TDZ, com formação de calos na base (B) e clorose foliar (C). Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 46
- Figura 3 – Formação calogênica (%) em epicótilos contendo nós cotiledonares de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de diferentes concentrações de BAP, CIN, 2iP ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 48
- Figura 4 – Vitrificação em epicótilos contendo nós cotiledonares, de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de diferentes concentrações de BAP, CIN, 2iP ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 50
- Figura 5 – Padrões de desenvolvimento observados em epicótilos, contendo nós cotiledonares, de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS. Observa-se em “A” somente o ápice desenvolvido, em “B” ápice e gemas (preexistentes no nó cotiledonar) desenvolvidas, em “C” necrose do ápice e gemas (preexistentes no nó cotiledonar) desenvolvidas, em “D” bom desenvolvimento de brotações adventícias, em “E” desenvolvimento de brotações adventícias curtas e, em “F”, vitrificação. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 51
- Figura 6 – Comprimento de brotações emitidas em epicótilos contendo nós cotiledonares, de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de diversas concentrações de BAP, CIN, 2iP ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 53
- Figura 7 – Número de folhas emitidas em epicótilos contendo o nó cotiledonar, de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de diferentes concentrações de BAP, CIN, 2iP ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 54
- Figura 8 – Formação calogênica (%) na base de brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 e aos 60 dias de cultivo, em meio nutritivo MS (acrescido de diferentes concentrações de ANA, AIB ou 2,4-D). Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 68

- Figura 9– Vitrificação (%) em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em porcentagem, aos 60 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de diferentes concentrações de ANA, AIB ou 2,4-D. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 69
- Figura 10 – Formação de raízes *in vitro* (%) em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 60 dias de cultivo, em meio nutritivo MS ou WPM acrescido de diferentes concentrações de AIB durante seis dias (tratamento “pulse”) e posterior cultivo nos respectivos meios com a concentração de sais reduzida à metade, na ausência de AIB. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 72
- Figura 11 – Aspecto das brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert na formação de raízes *in vitro* em diferentes substratos. Em A) brotações postas para formar raízes em areia, Plantmax®, ágar e vermiculita; em B) observa-se necrose que ocorreu na base das brotações cultivadas em meio contendo Plantmax®, aos 30 dias e em C), aos 60 dias; em D) planta com formação de raiz em meio nutritivo MS contendo 7 g.L⁻¹ de ágar; em E) intensa formação de calos observada na base das brotações em meio contendo vermiculita e em F) planta com formação de raiz em meio contendo vermiculita como substrato. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010..... 83

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Epicótilos de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert que emitiram brotações adventícias (%EBA), em porcentagem, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de 0,015 µM de ANA e diversas concentrações de BAP, CIN, 2iP ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....39
- Tabela 2 – Número médio de brotos por explante (Nº B/E) de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de 0,015 µM de ANA e de diferentes concentrações de BAP, CIN, 2iP ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....42
- Tabela 3 – Formação calogênica (%CALOS) em epicótilos de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de 0,015 µM de ANA e de diferentes concentrações de BAP, CIN, 2iP ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....44
- Tabela 4 – Brotações de epicótilos de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert que apresentaram clorose foliar *in vitro* (%CF), aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de 0,015 µM de ANA e de diferentes concentrações de BAP, CIN, 2iP ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....45
- Tabela 5 – Formação calogênica (%calos) e emissão de brotações adventícias (%EBA) em epicótilos de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de 5 µM de BAP, isolado ou combinado com diversas concentrações de CIN ou 2iP. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....56
- Tabela 6 – Formação de calos (%) em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo MS ou WPM, na presença ou ausência de AIB. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....65
- Tabela 7 – Formação de raízes *in vitro* (%) de brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo MS ou WPM, na presença ou ausência de AIB. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....66
- Tabela 8 – Sobrevivência (%) de brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 60 dias, cultivadas em diferentes substratos combinados com meio nutritivo MS acrescido de 10 µM de AIB. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....79
- Tabela 9 – Formação de calos (%) na base de brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 e aos 60 dias, cultivadas em diferentes substratos combinados com meio nutritivo MS acrescido de 10 µM de AIB. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....80

Tabela 10 – Formação de raízes *in vitro* (%) de brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 e aos 60 dias, cultivadas em diferentes substratos combinados com meio nutritivo MS acrescido de 10 µM de AIB. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.....82

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D – Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético

2 iP – Isopentenil Adenina

AIA – Ácido Indol Acético

AIB – Ácido 3-Indol Butírico

ANA – Ácido alfa-Naftaleno Acético

atm – Atmosfera

BA – Benziladenina

BAP – Benzilaminopurina

CIN – Cinetina

CV% – Coeficiente de Variação (%)

GA₃ – Ácido Giberélico

MET – Máxima Eficiência Técnica

MS – Meio nutritivo elaborado por Murashige & Skoog (1962)

MS/2 – Metade da concentração de sais do meio nutritivo elaborado por Murashige & Skoog (1962)

μM – Micromolar (10^{-6} M)

mM – Milimolar (10^{-3} M)

NaOCl – Hipoclorito de sódio

p/v – Peso/volume

pH – Potencial de hidrogênio

p – Probabilidade

QL – Meio nutritivo elaborado por QUOIRIN & LEPROIVRE(1977)

R² – Coeficiente de determinação

TDZ – Thidiazuron

TM – Taxa de Multiplicação

v/v – Volume/volume

WPM – “Wood Plant Medium”, meio nutritivo elaborado por Lloyd & McCown (1981)

WPM/2 – Metade da concentração de sais do “Wood Plant Medium”, meio nutritivo elaborado por Lloyd & McCown (1981)

ZEA – Zeatina

LISTA DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo A – Composição dos meios nutritivos MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981)..... | 94 |
|---|----|

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 20 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 22 |
| 2.1 Descrição da Espécie – Canafístula [<i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert] | 22 |
| 2.2 Micropropagação | 23 |
| 2.3 Meios Nutritivos | 24 |
| 2.4 Reguladores de Crescimento | 24 |
| 2.4.1 Citocininas na multiplicação <i>in vitro</i> | 25 |
| 2.4.2 Enraizamento de espécies lenhosas..... | 28 |
| 3 CAPÍTULO I | 33 |
| MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i> DE <i>Peltophorum dubium</i> SPRENGEL TAUBERT | 33 |
| 3.1 Objetivo | 33 |
| 3. 2 Material e Métodos | 33 |
| 3.2.1 Obtenção dos explantes..... | 33 |
| 3.2.2 Efeito de citocininas na multiplicação <i>in vitro</i> de epicótilos de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert..... | 34 |
| 3.2.3 Efeito de citocininas na multiplicação <i>in vitro</i> de epicótilos contendo o nó cotiledonar de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert..... | 35 |
| 3.2.4 Efeito de BAP, isolado ou em combinação com outras citocininas, na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert | 37 |
| 3.3 Resultados e discussão | 38 |
| 3.3.1 Efeito de citocininas na multiplicação <i>in vitro</i> de epicótilos de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert..... | 38 |
| 3.3.2 - Efeito de citocininas na multiplicação <i>in vitro</i> de epicótilos contendo o nó cotiledonar de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert..... | 46 |
| 3.3.3 Efeito de BAP, isolado ou em combinação com outras citocininas, na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert | 54 |
| 3.4 Conclusões | 56 |

| | |
|--|-----------|
| 4 CAPÍTULO II | 58 |
| EFEITO DE MEIOS NUTRITIVOS E AUXINAS NA FORMAÇÃO DE RAÍZES <i>in vitro</i> DE <i>Peltophorum dubium</i> (SPRENGEL) TAUBERT | 58 |
| 4.1 Objetivo | 58 |
| 4.2 Material e Métodos | 58 |
| 4.2.1 Obtenção das brotações | 59 |
| 4.2.2– Efeito do meio nutritivo e de AIB na formação de raízes <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert | 60 |
| 4.2.3 Efeito do tipo e concentração de auxinas na formação de raízes <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert | 61 |
| 4.2.4 Efeito do meio nutritivo e tratamentos “pulse” de AIB na indução e desenvolvimento <i>in vitro</i> de raízes em <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert | 62 |
| 4.3 Resultados e discussão | 64 |
| 4.3.1 – Efeito do meio nutritivo e de AIB na formação de raízes <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert | 64 |
| 4.3.2 Efeito do tipo e concentração de auxinas na formação de raízes <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert | 66 |
| 4.3.3 - Efeito do meio nutritivo e tratamentos “pulse” de AIB na indução e desenvolvimento <i>in vitro</i> de raízes em <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert | 70 |
| 4.4 Conclusões | 73 |
| 5 CAPÍTULO III | 75 |
| SUBSTRATOS ALTERNATIVOS NA FORMAÇÃO DE RAÍZES <i>in vitro</i> DE <i>Peltophorum dubium</i> (SPRENGEL) TAUBERT | 75 |
| 5.1 Objetivo | 75 |
| 5.2 Material e Métodos | 75 |
| 5.2.1 Obtenção das brotações | 75 |
| 5.2.2 Efeito de substratos alternativos na formação de raízes <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert..... | 76 |
| 5.3 Resultados e Discussão | 78 |
| 5.4 Conclusões | 83 |
| CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS | 85 |

| | |
|--|-----------|
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 86 |
| ANEXOS | 94 |

1 INTRODUÇÃO

A demanda por produtos de origem florestal tem se intensificado nas últimas décadas, implicando em uma necessidade crescente de tecnologia nos plantios florestais de rápido crescimento, desde a seleção de matrizes de alta produtividade até métodos eficientes de produção de mudas.

Em virtude da demanda crescente de mudas de espécies florestais e da busca constante de melhor produtividade dos povoamentos selecionados, a qualidade das mudas e a eficiência das técnicas de propagação utilizadas têm sido abordadas em vários trabalhos de pesquisa no Brasil. No caso de algumas espécies, já existem conhecimentos científicos e experiências suficientes para viabilizar uma produção de mudas bem sucedida. No entanto, as informações técnicas disponíveis para a produção de mudas de espécies nativas são escassas, o que limita o progresso de sua silvicultura, mas representa, por outro lado, muitas oportunidades de pesquisa. Essas espécies possuem uma enorme diversidade genética, potencial que pode servir como fonte para a obtenção de mudas com as características desejáveis à produção florestal. Associado a isso, técnicas de biotecnologia florestal, como a cultura de tecidos e a clonagem de árvores superiores, podem viabilizar a obtenção de matérias-primas de maior qualidade.

A canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert), pertencente à família Fabaceae, é uma espécie florestal que ocorre naturalmente no Rio Grande do Sul e em outros estados brasileiros. Por ser uma espécie de rápido crescimento, muito rústica e heliófila, é recomendada para reflorestamentos mistos de áreas degradadas. Sua madeira apresenta resistência moderada ao apodrecimento e é bastante usada na construção civil, apresentando potencial para utilização em sistemas produtivos e em escala comercial. Entretanto, existem escassas informações referentes às técnicas de propagação vegetativa visando a obtenção de mudas de qualidade desta espécie.

Já foram desenvolvidos, por Bassan (2006), alguns trabalhos com o objetivo de compreender o comportamento *in vitro* de *Peltophorum dubium*. Foram estudados métodos para a superação de dormência e para a desinfestação superficial de sementes, avaliados meios nutritivos e tipos de explantes adequados

para o estabelecimento *in vitro* da cultura, bem como foram avaliadas auxinas e carvão ativado no enraizamento *in vitro* das brotações. Os resultados indicaram que a espécie tem potencial para a micropropagação, no entanto, não permitiram o desenvolvimento de um protocolo eficiente de propagação clonal a partir da cultura de tecidos. A utilização de diferentes classes de fitorreguladores e alterações nos meios nutritivos podem auxiliar na indução de resultados mais promissores para o cultivo *in vitro* da espécie.

Em virtude disso e da importância ambiental e econômica que a espécie apresenta, o presente trabalho teve como objetivo contribuir com informações relacionadas à propagação por meio da cultura de tecidos de maneira a possibilitar o planejamento e a implementação de bancos de germoplasma *in vitro* e de estratégias de multiplicação de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert.

O trabalho está dividido em três capítulos, organizados de acordo com a fase do cultivo *in vitro* e os fatores que foram estudados, a saber:

- no capítulo I foi avaliado o efeito de diferentes fontes e concentrações de citocininas na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*. Os fitorreguladores foram testados isolados ou combinados entre si e, simultaneamente, na presença da auxina Ácido alfa-Naftaleno Acético (ANA) ou de carvão ativado no meio nutritivo;
- no capítulo II foi avaliado o efeito de meios nutritivos, de diferentes fontes e concentrações de auxinas no enraizamento *in vitro* de *Peltophorum dubium*, bem como o tempo de exposição das brotações a estes reguladores de crescimento;
- no capítulo III foram avaliados substratos alternativos ao ágar na formação de raízes *in vitro* de *Peltophorum dubium*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Descrição da Espécie – Canafístula [*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert]

Peltophorum dubium (Sprengel) Taubert, da família Fabaceae, conhecida como canafístula, acácia-amarela, angico bravo, tamboril, entre outros, é uma árvore longeva que ocorre naturalmente no Brasil desde 7°S na Paraíba a 29°S no Rio Grande do Sul, atingindo o limite Sul a 30°25'S em Artigas, no Uruguai (CARVALHO, 2003).

É característica da floresta latifoliada semidecídua da bacia hidrográfica do rio Paraná (LORENZI, 1992), desempenhando um papel pioneiro nas áreas abertas, em capoeiras e matas degradadas. Sua madeira, serrada e roliça, possui alto valor econômico, sendo indicada na construção civil para uso em vigas, caibros, ripas, marcos de portas, janelas e assoalhos. Em uso externo, é utilizada para mourões, dormentes e cruzetas, apresentando resistência moderada ao apodrecimento. No estado de São Paulo, *Peltophorum dubium* está ameaçada de extinção, sendo recomendada a sua conservação *ex situ* (CARVALHO, 2003).

As sementes de *Peltophorum dubium* apresentam forte dormência tegumentar que pode ser superada, em ambientes naturais, pelo aumento repentino da temperatura do solo por ocasião da abertura de clareiras na floresta. Para a obtenção de mudas, são sugeridos tratamentos de escarificação mecânica cortando-se o tegumento na região oposta àquela em que ocorre a protusão da radícula. O poder germinativo é alto (de até 95%) em sementes com superação de dormência, e baixo (no máximo 28%) naquelas sementes que não foram submetidas à superação de dormência (CARVALHO, 2003). A emergência ocorre de 15 a 30 dias e o desenvolvimento das mudas é rápido, as quais são consideradas prontas para o plantio no local definitivo em 4 a 5 meses (LORENZI, 2002).

Peltophorum dubium apresenta potencial para a micropropagação por meio da emissão de gemas laterais e, para a obtenção de clones desta espécie, é necessário que seja otimizada a capacidade dos ápices caulinares desenvolverem

gemas laterais por períodos mais longos, que as taxas de multiplicação sejam aumentadas e que seja obtida uma maior frequência de rizogênese (CARVALHO, 2003). Em estudo realizado por Bassan et al. (2006), o meio nutritivo que proporcionou resultados superiores em relação ao número de nós, número de folhas e tamanho da parte aérea de explantes foi o meio base MS, desenvolvido por Murashige; Skoog (1962), quando comparado ao meio WPM. Em relação ao enraizamento, não foi observada diferença entre os dois meios, uma vez que foi formada apenas uma raiz em um explante do tipo segmento apical caulinar, cultivado no meio nutritivo MS, correspondendo a 0,025% de enraizamento. Esse fato demonstra que os meios testados não estimularam a rizogênese em canafístula e indica que devem ser efetuadas alterações na composição dos meios para que haja formação de raízes em *Peltophorum dubium*.

2.2 Micropropagação

A micropropagação é a aplicação mais prática da cultura de tecidos, sendo sua utilização em âmbito comercial já realizada em diversos países do mundo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Um dos objetivos da micropropagação é a maximização da multiplicação de gemas. Esta técnica possibilita um rápido aumento no número de plantas geneticamente idênticas partindo de plantas selecionadas, permitindo a produção de mudas durante o ano todo, a formação de plantas com elevada qualidade sanitária e, ainda, auxiliando na propagação de plantas cujas sementes têm baixa germinação. No entanto, o sucesso na micropropagação é especialmente difícil em espécies ditas recalcitrantes ao cultivo *in vitro* e depende do controle da morfogênese (GIRI et al., 2004).

O crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e pelo balanço dos reguladores de crescimento existentes no meio nutritivo, principalmente auxinas e citocininas (VILLA et al., 2007). A maneira complexa com que os reguladores de crescimento e as células interagem indica que, se o tecido não está em um estágio responsivo, não irá responder adequadamente aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações essas substâncias são utilizadas. A ausência na resposta a um

regulador de crescimento é, frequentemente, um problema em cultivos *in vitro* (ALVES et al., 2004).

2.3 Meios Nutritivos

O crescimento de plantas, órgãos, tecidos e células *in vitro* depende do desenvolvimento de meios nutritivos otimizados para a perfeita interação de componentes essenciais como fontes de carbono e nutrientes minerais. Os fatores que limitam esse crescimento *in vitro* são similares àqueles que o limitam *in vivo* (Wu et al., 2009).

A elevada variabilidade no comportamento *in vitro* de espécies lenhosas faz com que seja necessário escolher condições de cultivo para cada espécie e para os diferentes genótipos. Portanto, a escolha adequada do meio nutritivo, bem como dos reguladores de crescimento, constituem etapas relevantes no processo de micropropagação (RADMAN et al., 2009). De maneira geral, utilizam-se um meio básico composto de macro e micronutrientes, vitaminas, inositol, fonte de açúcar (geralmente sacarose), e eventualmente outros compostos orgânicos (como aminoácidos) e outras substâncias quimicamente indefinidas (como água de coco e extrato de malte) e, também, reguladores de crescimento. Os meios nutritivos comumente usados com espécies florestais são o MS de Murashige e Skoog (1962), cuja formulação foi desenvolvida, inicialmente, para tecido medular de *Nicotiana tabacum*, e o WPM (“Woody Plant Medium”) elaborado por Lloyd e McCown (1981), para a propagação de plantas lenhosas.

2.4 Reguladores de Crescimento

Os hormônios vegetais podem ser definidos como substâncias naturais (fitormônios) ou sintéticas (fitorreguladores) adicionadas ao meio nutritivo (TERMIGONI, 2005). Na multiplicação de espécies lenhosas, a maior parte dos trabalhos desenvolvidos inclui a adição de fitorreguladores.

A adição de reguladores de crescimento ao meio nutritivo tem como objetivo suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que foram isolados da planta matriz, bem como estimular o alongamento ou a multiplicação da parte aérea (CALDAS et al., 1998).

As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores de crescimento (CALDAS et al., 1998).

Existem várias substâncias que pertencem a cada uma dessas classes de reguladores e que são usadas, de acordo com o objetivo do estudo, nos meios nutritivos. As várias auxinas (Ácido alfa Naftaleno Acético - ANA, Ácido Indolacético - AIA, Ácido Indol Butírico - AIB e Ácido 2,4 - Diclorofenoxiacético - 2,4-D, entre outras), dão respostas diferentes *in vitro*, sendo que AIB é, frequentemente, a melhor auxina para a indução de raízes (CALDAS et al., 1998) e ANA é bastante utilizado em meios de isolamento, porém, se adicionada em concentrações acima de alguns décimos de miligramas, tende a estimular a formação de calos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Também existem diferenças entre as citocininas (6-Benzilaminopurina - BAP, Zeatina - ZEA, Cinetina – CIN, Isopentenil Adenina – 2iP, entre outras), sendo que BAP induz à formação de grandes números de brotos e à alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação (CALDAS et al., 1998). Graça et al. (2001), ao compararem o efeito de BAP e Thidiazuron (TDZ) na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii*, relataram que BAP apresentou efeito superior quanto à produção de brotações, além de induzir baixa formação de calo. De acordo com Barrueto Cid (2000), BAP é a citocinina sintética de menor custo em relação às demais fontes desta classe de reguladores de crescimento, sendo a mais ativa e mais utilizada na multiplicação de diversas espécies.

2.4.1 Citocininas na multiplicação *in vitro*

A adição de citocininas ao meio nutritivo é favorável, ou até necessária, sendo que a definição do tipo e da concentração ótima de citocinina para a multiplicação

constitui um passo importante. Experimentos testando diversas combinações de citocinina com outros fitorreguladores são muito comuns para o ajuste dos meios nutritivos.

Diferenças entre as citocininas têm sido relatadas. BAP induz à formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação, enquanto que CIN e 2iP têm permitido apenas o crescimento normal, sem brotações múltiplas (CALDAS et al., 1998). Ratificando esse comportamento, em *Prunus persica* (pessegueiro) foi registrado um aumento na multiplicação com o incremento de BAP, sendo que, nas concentrações testadas (0 a 4 mg L⁻¹ ≈ 0 a 17,6 μM), este fitorregulador foi mais eficiente do que 2iP (RADMAN et al., 2009). A multiplicidade de brotações é característica da citocinina BAP, que induz à formação de grande número de brotações e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação. Contudo, as brotações em meio nutritivo contendo BAP não foram homogêneas para *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* (videira). Além disso, concentrações muito elevadas também se mostraram prejudiciais, causando a formação de brotações anormais e hiperhídricas, efeito denominado vitrificação (MACHADO et al., 2006). Nem sempre o acréscimo de citocinina exógena ao meio nutritivo aumenta o número de brotações formadas, podendo levar à formação de desordens fisiológicas como a vitrificação dos explantes e a redução no crescimento das brotações. A menor exigência de citocinina para determinados genótipos pode estar associada aos altos teores endógenos que, aliados à adição deste regulador de crescimento ao meio nutritivo, podem contribuir para um efeito decrescente na taxa de multiplicação (RADMAN et al., 2009).

Outras substâncias químicas com atividade de citocinina também têm sido utilizadas, entre elas TDZ, que surgiu como um regulador altamente eficaz em culturas de tecidos de um conjunto diversificado de espécies, que se estende desde gramíneas e herbáceas, por exemplo, até espécies lenhosas. TDZ é relativamente estável em sistemas de regeneração e podem ser induzidas respostas fisiológicas mesmo após o armazenamento a longo prazo das soluções estoque (MURTHY et al., 1998).

A faixa da concentração de BAP que resultou em maior taxa de proliferação de gemas axilares por explante em um clone de *Eucalyptus* sp. foi a de 0,25 a 0,50 mg L⁻¹ (1,1 a 2,2 μM), aos 60 dias após a inoculação no meio nutritivo.

Concentrações de BAP acima de $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ ($3,3 \text{ }\mu\text{M}$) não resultaram em efeitos positivos quanto à proliferação de gemas, e, na concentração de 1 mg L^{-1} ($4,4 \text{ }\mu\text{M}$) de BAP, além de terem ocorrido sintomas de hiperhidricidade, houve oxidação dos explantes do clone (BRONDANI et al., 2009).

A suplementação de combinações de citocininas e auxinas nos meios nutritivos tem apresentado respostas variadas na indução e formação de gemas adventícias em explantes *in vitro*. Diferentes concentrações de BAP e CIN combinadas ou não com ANA foram avaliadas quanto à resposta organogênica *in vitro* de segmentos de epicótilo de *Citrus aurantium* L. (laranja-azedo). A suplementação de BAP em combinação ou não com ANA mostrou-se favorável à obtenção de explantes responsivos. Entretanto, 1 mg L^{-1} ($4,6 \text{ }\mu\text{M}$) de CIN e 3 mg L^{-1} ($13,9 \text{ }\mu\text{M}$) de CIN, combinados com $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ ($1,6 \text{ }\mu\text{M}$) de ANA, não demonstraram indução de organogênese (SILVA et al., 2008).

A combinação 2 mg L^{-1} ($8,8 \text{ }\mu\text{M}$) de BAP e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ($2,8 \text{ }\mu\text{M}$) de AIA adicionada ao meio nutritivo MS foi aquela que proporcionou a formação *in vitro* de maior número de brotações adventícias em segmentos internodais de *Hancornia speciosa* (mangabeira). O meio nutritivo MS suplementado com 1 ou 2 mg L^{-1} ($4,4$ ou $8,8 \text{ }\mu\text{M}$) de BAP + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ($2,8 \text{ }\mu\text{M}$) de AIA proporcionou o maior comprimento médio das brotações (BASTOS et al., 2007).

As vantagens da utilização conjunta dos reguladores de crescimento TDZ e ANA foram citadas por Lu (1993), em que TDZ apresentou maior eficiência na presença de ANA. Contudo, longas exposições ao TDZ podem causar hiperhidricidade, crescimento anormal de gemas e dificuldade no enraizamento (LU, 1993).

Samsudeen Varisai et al. (1999) apud Rocha et al. (2007) indicaram que BAP, isolado ou em combinação com outras citocininas, induz à organogênese a partir de ápices caulinares de *Macrotyloma uniflorum* (dólico). Números maiores de brotos múltiplos foram desenvolvidos a partir de nós cotiledonares em meio MS contendo BAP combinado com CIN ou 2iP. Além disso, os brotos múltiplos desenvolvidos com uma combinação de BAP ($4,4 \text{ }\mu\text{M}$) e 2iP ($14,7 \text{ }\mu\text{M}$) cresceram mais rápido do que aqueles cultivados apenas em presença de BAP ($4,4 \text{ }\mu\text{M}$).

Em *Cabralea canjerana* (canjerana), segmentos nodais inoculados em meio nutritivo MS ou WPM, produziram as maiores taxas de multiplicação (TM) no

tratamento contendo apenas 2,5 μM de BAP (TM = 1,42) ou com a combinação BAP (2,5 μM) + 2iP (2,5 μM), em que TM = 1,66. As maiores porcentagens de explantes com brotos foram observadas na presença apenas de BAP (25 a 27%) ou de BAP combinado com 2iP (25 a 37%) (ROCHA et al, 2007).

Em segmentos nodais de *Swietenia macrophylla* King (mogno) altas taxas de multiplicação (7,22 brotos por segmento) foram obtidas em meio nutritivo MS contendo 10 μM de BAP combinado com 2,2 μM de 2iP. Entretanto, a taxa de multiplicação foi baixa (inferior a 1,00) no meio suplementado com apenas 2iP (2,2 μM) (SCHOTTZ, 2007).

2.4.2 Enraizamento de espécies lenhosas

Esta etapa caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo, assim, o posterior transplante para condições *ex vitro*. A rizogênese ocorre de uma a três semanas e pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento de raízes. Enquanto as duas primeiras fases (às vezes consideradas como uma só) respondem ou dependem de auxina, o crescimento das raízes é inibido por sua presença. A dificuldade em um sistema de micropropagação está em determinar uma condição *in vitro* na qual todas essas fases possam ocorrer normalmente e, de preferência, sem demandar manipulação adicional de uma fase para outra (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os maiores obstáculos ao conhecimento adequado dos fenômenos envolvidos no processo de formação de raízes adventícias residem na dificuldade de isolar e caracterizar os fatores que controlam estes fenômenos, em virtude da sua complexidade e da grande interação existente entre eles. Alguns pontos básicos devem ser observados quando se deseja desenvolver metodologias de enraizamento *in vitro* para espécies como as lenhosas, consideradas recalcitrantes a esta fase da micropropagação. Os fatores importantes incluem a escolha e as condições de cultivo da planta doadora, a composição do meio nutritivo e as condições de incubação, bem como as características do explante em si (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

No que se refere ao meio nutritivo, os fatores que podem ser testados para a otimização do enraizamento *in vitro* incluem substâncias reguladoras de crescimento, sais minerais, carvão ativado, carboidratos, além dos fatores físicos. Entre os carboidratos, a sacarose tem sido frequentemente utilizada. Concentrações inferiores às empregadas na multiplicação têm, de uma maneira geral, proporcionado melhores resultados no enraizamento em várias espécies (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). No entanto, para *Peltophorum dubium*, a redução na concentração de sacarose de 30 g L⁻¹ para 10 ou 20 g L⁻¹ não foi capaz de induzir o enraizamento (BASSAN, 2006).

As auxinas são os únicos reguladores de crescimento que aumentam consistentemente a formação de primórdios radiculares, pelo menos em tecidos que naturalmente apresentam certa predisposição ao enraizamento. Skoog e Miller, em 1957, mostraram que a reação do tecido *in vitro* depende do balanço entre auxina e citocinina: aumentando a concentração da primeira haveria formação de raízes; aumentando a da segunda, de gemas adventícias; e, numa relação intermediária, haveria a formação de calo (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

As auxinas mais utilizadas são AIB e ANA (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). As respostas às auxinas, no entanto, não são universais. Certas espécies, principalmente as lenhosas, enraízam com dificuldade ou não enraízam, mesmo na presença de auxinas e algumas espécies até dispensam o uso de reguladores de crescimento no seu enraizamento (SOARES et al., 2007). As herbáceas, por exemplo, enraízam com níveis muito reduzidos de auxina ou em meio básico sem substâncias de crescimento. Nesse caso, as partes aéreas em rápido crescimento são fontes de intensa produção de auxina, a qual é translocada para a base, estimulando a rizogênese (VILLA et al., 2010).

Espécies ou mesmo cultivares diferentes reagem de maneira diversa a concentrações distintas de auxinas. A concentração ótima, para uma certa planta, pode ser insuficiente ou muito elevada para outra. Para o enraizamento de microestacas de *Rubus* sp. (amoreira-preta) cultivar Brazos, foram obtidas mais de 95% de microestacas enraizadas e constatou-se que não haveria necessidade de imersão em AIB. Esta ocorrência deveu-se, provavelmente, à facilidade de enraizamento da espécie e, particularmente, da cultivar testada (AUGUSTO et al., 2006). Segundo Assis e Teixeira (1998), há várias evidências de que a formação de raízes é geneticamente controlada, pois se observa grande variação entre espécies,

cultivares e clones, com relação à maior ou menor habilidade natural em formar raízes.

Em microestacas de *Cydonia oblonga* Mill. cv. MC (marmeleiro), utilizadas como porta-enxerto para *Pyrus* spp (pereira), não houve diferença no enraizamento e número médio de raízes, entre os tipos de auxina utilizados (AIB, ANA e AIA), nas concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20 μM , durante sete dias (tratamento “pulse”), em meio nutritivo constituído pelos sais de MS reduzidos à metade de sua concentração original (ERIG; SCHUCH, 2004).

Em *Swietenia macrophylla* (mogno), a maior formação de raízes foi observada nos segmentos apicais caulinares com o emprego de 2 mg L^{-1} (10,7 μM) de ANA (LOPES et al., 2001). Estes autores relataram, também, que AIB foi a auxina que apresentou o pior desempenho, tanto em relação ao enraizamento quanto ao número médio de raízes formadas, avaliando segmentos apicais caulinares e brotações. Além disso, as raízes surgidas apresentaram-se esbranquiçadas e sem ramificações, ou seja, não houve a formação de raízes secundárias ou pelos absorventes. No entanto, para brotações obtidas a partir de segmentos nodais de *Cordia trichotoma* (louro-pardo), AIB induziu melhores resultados de enraizamento, quando comparado a ANA (MANTOVANI et al., 2001). A maior formação de raízes (73%) foi obtida com a combinação de 0,5 mg L^{-1} (2,5 μM) de AIB e 1,5 g L^{-1} de carvão ativado. A auxina ANA provocou excesso de calosidade inibindo a multiplicação e o desenvolvimento das brotações e dificultando o enraizamento e o desenvolvimento do sistema radicular.

A concentração de auxinas pode afetar a qualidade das raízes, principalmente no que se refere à conexão vascular, sendo que a formação de raízes normais verifica-se em concentrações mais baixas; altas concentrações tendem a produzir muito calo na zona de enraizamento. Uma menor duração do período de exposição dos explantes às substâncias químicas do meio pode levar a um melhor balanço entre raiz e parte aérea, produzindo plantas mais saudáveis (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). Para evitar a inibição do enraizamento pela presença constante da auxina no meio, tem sido utilizados tratamentos “pulse”, que consistem em manter os explantes por um período curto na presença desta substância. Em seguida, faz-se a inoculação em um novo meio nutritivo sem regulador de crescimento (LOPES et al., 2001; ERIG; SCHUCH, 2004).

A formação de raízes adventícias em várias espécies lenhosas tem sido beneficiada pelo uso de carvão ativado no meio de enraizamento. Esta substância tem a propriedade de modificar a composição dos meios nutritivos, adsorvendo uma série de substâncias adicionadas ao meio, liberadas pelos explantes ou presentes no ágar. Outra propriedade atribuída ao carvão ativado, como sendo benéfica no processo de enraizamento, diz respeito à redução da intensidade de luz na região de formação de raízes, simulando a condição de escuro de alguns substratos.

Para o enraizamento *in vitro* de *Rubus* sp (amoreira-preta), a utilização de carvão ativado no meio nutritivo, não favoreceu o enraizamento, em concentrações de 0, 10 e 20 g L⁻¹ (LEITZKE et al., 2009). De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), o carvão ativado em concentrações de 1 a 20 g L⁻¹ pode ser benéfico em alguns casos. Fisicamente, ele simula a condição de escuro, no qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor. Quimicamente, o carvão ativado tem efeito adsorvente, retendo parte de todos os elementos que compõem o meio. Entretanto, a adição de carvão ao meio nutritivo nem sempre tem se mostrado vantajosa. Nicoloso et al. (2001) verificaram que a porcentagem de enraizamento em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (ginseng brasileiro) não foi influenciada pela presença de carvão ativado no meio nutritivo; resultado semelhante foi encontrado por Erig et al. (2004), trabalhando com *Pyrus* sp (pereira 'Carrick'). Os autores verificaram que a porcentagem de enraizamento foi nula, com a utilização de 1 g L⁻¹ de carvão ativado no meio nutritivo. Já Santana et al. (2005), avaliando a influência do AIB e do carvão ativado em brotações de *Annona glabra* L. (ariticum), verificaram efeitos positivos da adição do carvão sobre o número de raízes, número de raízes secundárias, comprimento da maior raiz, porcentagem de enraizamento e peso seco das raízes.

Quanto à constituição do meio de enraizamento, embora o ágar seja citado em vários trabalhos de enraizamento *in vitro* das brotações de espécies frutíferas lenhosas, tem-se observado que o sistema radicular formado nas brotações cultivadas em meio nutritivo solidificado com ágar é quebradiço e não possui pelos radiculares; além disto, dentre os componentes do meio nutritivo, o ágar é a substância de maior custo (VIAGANÓ et al., 2007). As raízes formadas em meios contendo ágar, em geral, são pouco eficientes na absorção de água e nutrientes durante a aclimatização. A baixa qualidade da raiz formada pode ser uma das causas da baixa sobrevivência das plantas durante a aclimatização (HOFFMANN et al., 2001).

O uso de substratos alternativos para o enraizamento, visando a obtenção de um sistema radicular mais apropriado para a adaptação da planta em casa de vegetação já foi testado em diversos trabalhos e pode ser útil em sistemas intensivos de micropropagação. Nesse sentido, Grattapaglia e Machado (1998) mencionaram que vermiculita, perlita ou espumas de poliuretano embebidas com meio líquido podem ser alternativas mais baratas e dar melhores resultados do que o ágar.

3 CAPÍTULO I

MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE *Peltophorum dubium* SPRENGEL TAUBERT

3.1 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de citocininas isoladas e combinadas entre si ou com a auxina ANA na multiplicação *in vitro* de epicótilos e de epicótilos contendo o nó cotiledonar em *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert.

3.2 Material e Métodos

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da UFSM, em Santa Maria, RS.

As sementes foram coletadas e armazenadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro/Florestas em Santa Maria, RS, e são provenientes da produção de 2004. Na UFSM, permaneceram armazenadas em frascos de vidro sob temperatura de 8-10^o C até o seu emprego em experimentos.

3.2.1 Obtenção dos explantes

Inicialmente, as sementes foram submetidas à superação de dormência através de escarificação mecânica com lixa nº 100 na região oposta ao embrião. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas superficialmente em

solução de etanol a 70% (v/v) por 30 segundos e, após em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2 % (v/v) por 15 minutos, passando, então, por triplo enxágue em água destilada e autoclavada.

Visando a germinação *in vitro*, as sementes foram inoculadas, em câmara de fluxo laminar, em frascos de vidro com capacidade para 150 ml, contendo 30 ml de meio ágar-água a 0,7% (p/v), previamente autoclavado por um período de 40 minutos a 120 °C e 1 atm. Em cada frasco foram colocadas três sementes. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo sob temperatura de 25±3 °C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20 μmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Decorridos 30 dias de cultivo, os explantes (epicótilos contendo uma ou duas gemas axilares e epicótilos contendo os nós cotiledonares) foram isolados e utilizados nos trabalhos de multiplicação *in vitro* descritos a seguir.

3.2.2 Efeito de citocininas na multiplicação *in vitro* de epicótilos de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Epicótilos contendo uma ou duas gemas axilares (Figura 1 – A), com, aproximadamente, 8 a 10 mm de comprimento, foram isolados das plântulas estabelecidas em condições assépticas com 30 dias de cultivo (como anteriormente descrito no item 3.2.1) e, a seguir, inoculados sob câmara de fluxo laminar. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x3, em que os níveis do fator “A” referiram-se ao tipo de citocinina e os níveis do fator “B”, às concentrações avaliadas. Os tratamentos consistiram de 0, 5 ou 10 μM das citocininas 6-Benzilaminopurina (BAP), Cinetina (CIN), Isopenteniladenina (2iP) e Thidiazuron (TDZ), totalizando 12 tratamentos com oito repetições cada. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro de 150 ml contendo 30 ml de meio nutritivo e três explantes.

Foi utilizado o meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar e 0,015 μM da auxina Ácido alfa-Naftaleno Acético (ANA) acrescido das diferentes citocininas, conforme o tratamento. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente,

o meio nutritivo foi autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão por 15 minutos. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo sob temperatura de 25±3 °C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias do tipo luz do dia.

As avaliações foram realizadas após 30 dias de cultivo. As variáveis analisadas foram: sobrevivência (%SOB), explantes que emitiram brotações adventícias (%EBA), explantes que formaram calo (%CALOS), brotações que apresentaram clorose foliar (%CF) - expressas em porcentagem e número de brotos por explante (Nº B/E).

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi utilizado, para a comparação das médias o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Quando houve interação entre os níveis dos fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. Nas análises estatísticas utilizou-se o programa SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000).

3.2.3 Efeito de citocininas na multiplicação *in vitro* de epicótilos contendo o nó cotiledonar de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Epicótilos (Figura 1 - A) contendo o nó cotiledonar (Figura 1 – B e C) com, aproximadamente, 8 a 10 mm de comprimento, foram isolados de plântulas estabelecidas em condições assépticas com 30 dias de cultivo (como anteriormente descrito no item 3.2.1) e, a seguir, inoculados no meio nutritivo sob câmara de fluxo laminar. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x4, em que os níveis do fator “A” referiram-se ao tipo de citocinina e os níveis do fator “B”, às concentrações avaliadas. Os tratamentos consistiram de 0; 5; 10 ou 15 μM das citocininas BAP, CIN, 2iP e TDZ, totalizando 16 tratamentos

com oito repetições cada. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro de 150 ml contendo 30 ml de meio nutritivo e três explantes.

Foi utilizado o meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar e 1 g L⁻¹ de carvão ativo acrescido das diferentes citocininas, conforme o tratamento. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão por 15 minutos. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo sob temperatura de 25±3 °C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20 μmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias do tipo luz do dia.

As avaliações foram realizadas após 30 dias de cultivo. As variáveis analisadas foram: sobrevivência (%SOB), explantes que emitiram brotações adventícias (%EBA), explantes que formaram calo (%CALOS) e brotações que apresentaram vitrificação (%VITRIF) - expressas em porcentagem; número de brotos por explante (Nº B/E), comprimento de brotações (CB), em cm, e número de folhas por explante (NF).

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi utilizado, para a comparação das médias o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro, para tratamentos qualitativos. Para tratamentos quantitativos foi realizada análise de regressão polinomial. Quando houve interação entre os níveis dos fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000).

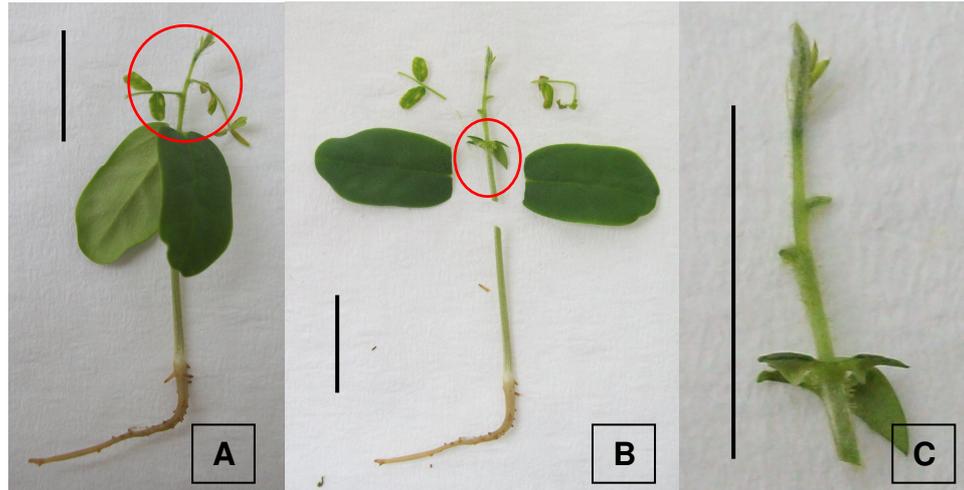


Figura 1 – Fonte de explantes e tipos de explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert utilizados nos experimentos de multiplicação *in vitro*. A) Plântula germinada *in vitro*, aos 30 dias, com detalhe indicando o epicótilo; B) Cortes realizados para isolamento do epicótilo com o nó cotiledonar e C) Epicótilo contendo o nó cotiledonar. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

3.2.4 Efeito de BAP, isolado ou em combinação com outras citocininas, na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Epicótilos contendo uma ou duas gemas axilares, apresentando, aproximadamente, 8 a 10 mm de comprimento, foram isolados de plântulas estabelecidas em condições assépticas com 30 dias de cultivo (como anteriormente descrito no item 3.2.1) e, a seguir, inoculados sob câmara de fluxo laminar. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e os tratamentos consistiram de 5 μM da citocinina BAP, isolada ou combinada com 0; 5 ou 10 μM das citocininas CIN ou 2iP, totalizando cinco tratamentos com seis repetições cada. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro de 150 ml contendo 30 ml de meio nutritivo e três explantes.

Foi utilizado o meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 7 g L^{-1} de ágar e 1 g L^{-1} de carvão ativado, acrescido das diferentes citocininas, conforme o tratamento. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, o meio nutritivo foi

autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão por 15 minutos. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo sob temperatura de 25±3 °C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

As avaliações foram realizadas após 30 dias de cultivo. As variáveis analisadas foram: sobrevivência (%SOB), explantes que emitiram brotações adventícias (%EBA) e explantes que formaram calo (%CALOS), expressas em porcentagem.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi utilizado, para a comparação das médias, o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Efeito de citocininas na multiplicação *in vitro* de epicótilos de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Para a sobrevivência não houve interação significativa ($p=0,9695$), efeito das concentrações ($p=0,2658$) e nem das citocininas testadas ($p=0,8641$), sendo observada uma elevada média geral (91,9%; CV= 10,84%). Esses resultados revelam que, para a sobrevivência de epicótilos de *Peltophorum dubium*, as citocininas testadas não são necessárias, independente da concentração utilizada.

Houve interação significativa ($p=0,0003$) dos fatores estudados (concentrações e citocininas) para a porcentagem de explantes que emitiram brotações adventícias e número de brotos por explante, ambos apresentando os

mesmos valores de probabilidade de erro. A concentração a ser utilizada vai depender da escolha da citocinina e vice-verso. Os resultados obtidos podem ser observados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Não houve emissão de brotações adventícias na ausência de citocininas (Tabela 1), mas, na medida em que estas foram adicionadas ao meio nutritivo esse evento passou a ocorrer, indicando que há necessidade de utilização destes fitorreguladores. Para BAP, 2iP e TDZ não houve diferenças significativas entre as concentrações 5 e 10 μM , as quais, por sua vez, foram superiores em relação à ausência de citocininas. Com a utilização das citocininas 2iP e TDZ foram obtidas as maiores porcentagens de emissão de brotações adventícias. No entanto, na concentração 5 μM , estas citocininas diferiram apenas de CIN, que apresentou os piores resultados. A 10 μM , TDZ não diferiu de 2iP que, por sua vez, não diferiu de BAP; porém TDZ, 2iP e BAP diferiram de CIN, mostrando-se superiores na emissão de brotações adventícias.

Tabela 1 – Epicótilos de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert que emitiram brotações adventícias (%EBA), em porcentagem, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de 0,015 μM de ANA e diversas concentrações de BAP, CIN, 2iP ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

| μM | EBA (%) | | | | | | | | | |
|---------------|---------|------|------|-----|-------|------|-------|-----|-----------|------|
| | BAP | | CIN | | 2 iP | | TDZ | | Média (%) | |
| 0 | 0,00 | b* A | 0,00 | a A | 0,00 | b A | 0,00 | b A | 0,00 | 0,00 |
| 5 | 36,40 | a A | 3,30 | a B | 39,70 | a A | 49,70 | a A | 32,28 | |
| 10 | 33,00 | a B | 0,00 | a C | 53,00 | a AB | 73,00 | a A | 39,75 | |
| Média (%) | 23,13 | | 1,10 | | 30,90 | | 40,90 | | 24,00 | |
| CV (%) | 14,69 | | | | | | | | | |

* médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado.

Explantes de *Prunus* sp cultivados na ausência de BAP também não formaram brotações adventícias, evidenciando, assim, uma dependência da adição de citocinina para a indução de brotações (ROCHA et al., 2009). Estudando o efeito das citocininas BAP e CIN, até 5 μM , adicionadas ao meio nutritivo MS e WPM, sobre a indução de brotações múltiplas a partir de nós cotiledonares em *Cedrela fissilis* (cedro), foi observado o desenvolvimento de brotações, em 80 a 90% dos explantes, em todos os tratamentos testados, mesmo sem a adição de citocininas, diferentemente do que foi verificado no presente estudo com estes mesmos reguladores (AMARAL, 2006). Para *Peltophorum dubium*, no presente trabalho, com a utilização de 2iP e TDZ no meio nutritivo, foi observado pouco desenvolvimento e amarelecimento das brotações. Este fato parece ter sido desencadeado pela utilização, em conjunto com as citocininas, da auxina ANA no meio nutritivo, uma vez que em trabalhos anteriores (dados não publicados), testando as mesmas citocininas e concentrações, porém sem a presença de ANA, as brotações apresentaram maior vigor. Em *Cordia trichotoma* (louro-pardo), segmentos nodais cultivados em meio WPM acrescido de ANA e Ácido Giberélico - GA_3 (ambos a 0,1 $\text{mg L}^{-1} \approx 0,5$ e 0,3 μM respectivamente), formaram brotações múltiplas em resposta à presença dos reguladores de crescimento. Nesse mesmo trabalho, BAP mostrou-se mais eficiente em relação à taxa de multiplicação ($\text{TM} = 5,3$) e, também, proporcionou a obtenção de brotações mais longas quando comparado à TDZ ($\text{TM} = 2,5$), ambos a 0,45 μM . Os autores mencionaram que, inicialmente, TDZ proporcionou uma grande proliferação de brotações, porém, ao longo do cultivo, tais brotações apresentaram-se malformadas, com caules curtos e retorcidos e folhas atípicas (MANTOVANI et al., 2001).

Em *Didymopanax morototoni* (caixeta) foi observado comportamento semelhante; a combinação de 1 mg L^{-1} TDZ (4,5 μM) e 0,1 mg L^{-1} ANA (0,5 μM) não promoveu a formação de novas brotações e aquelas já formadas amareleceram e não apresentaram nenhum desenvolvimento após três subcultivos (MANTOVANI et al., 1999). Adicionalmente, a multiplicação, o crescimento e a qualidade das brotações nos tratamentos contendo reguladores de crescimento foram inferiores àquelas observadas no tratamento contendo apenas carvão ativado. Esse fato foi atribuído à soma dos níveis endógenos de citocininas à concentração presente no meio nutritivo, que poderia ter provocado toxidez, resultando em um efeito inibitório na multiplicação das brotações. Quando cultivadas na presença de carvão ativado,

as brotações apresentaram-se com folhas verdes e caules alongados, que permitiram o seu isolamento. Este efeito benéfico do carvão ativado também foi observado para *Peltophorum dubium* em um trabalho anterior a este (dados não publicados), em que foram utilizadas as mesmas citocininas e concentrações, porém na ausência de ANA e com a utilização de 1 g L^{-1} de carvão ativado. Não foi observada a emissão de brotações adventícias, contudo, as partes aéreas apresentaram-se bem vigorosas e, aparentemente, em melhores condições para subcultivo do que aquelas desenvolvidas na presença de ANA. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de o carvão ativado ter a propriedade de adsorver substâncias tóxicas liberadas pela própria planta ou presentes no meio nutritivo. No entanto, há que se considerar que o carvão pode adsorver os reguladores de crescimento adicionados ao meio nutritivo, tornando-os disponíveis em menor quantidade para as plantas. Nesse caso, muitas vezes, torna-se necessária a utilização de concentrações mais elevadas de reguladores para que se obtenham as respostas desejadas.

Na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Eugenia involucrata* DC. (cerejeira), o uso de TDZ combinado a ANA favoreceu a emissão de brotações e de gemas nos explantes, especialmente a $32 \text{ }\mu\text{M}$. Concentrações intermediárias de TDZ também promoveram brotações, mas induziram à ocorrência de hiperhidricidade nos explantes (GOLLE, 2010).

Em *Eucaliptus dunni*, Graça et al. (2001) obtiveram um número significativamente maior de brotações com BAP do que com TDZ, quando foram adicionados ao meio MS nas concentrações 1 a $10 \text{ }\mu\text{M}$. Além disso, as brotações cultivadas em meio nutritivo suplementado com TDZ se apresentaram amareladas, pouco desenvolvidas e com formação excessiva de calos na base.

As variadas respostas na multiplicação *in vitro* de brotações de espécies lenhosas empregando citocininas se devem à espécie em questão e à concentração utilizada. No caso de TDZ, por ser considerado mais potente que as demais citocininas, é recomendado o uso de faixas de concentrações menores quando se pretende compará-lo com outros reguladores de crescimento (HUETTEMAN; PREECE, 1993).

No que se refere ao número de brotos por explante (Tabela 2), assim como para a emissão de brotações adventícias, houve diferença entre a presença (5 e $10 \text{ }\mu\text{M}$) ou não de citocininas ($0 \text{ }\mu\text{M}$). Para BAP e 2iP, 5 e $10 \text{ }\mu\text{M}$ não diferiram entre si;

para TDZ, 10 μM mostrou-se superior a 5 μM , permitindo a obtenção do dobro do número de brotos por explante. No entanto, comparada às outras citocininas, a 10 μM , TDZ não diferiu de BAP e 2iP, apenas de CIN, em cuja presença não houve emissão de brotações. A 5 μM foi observado resultado semelhante, porém BAP não diferiu das demais citocininas. Dutra et al. (2004) observaram ausência de respostas na indução de brotações, em *Olea europaea* (oliveira), em meio MS, suplementado com 0 a 4 mg L^{-1} (17,6 μM) de BAP combinado com ANA nas concentrações de 0 a 1 mg L^{-1} (5,4 μM).

Tabela 2 – Número médio de brotos por explante (Nº B/E) de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de 0,015 μM de ANA e de diferentes concentrações de BAP, CIN, 2iP ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

| Nº B/E | | | | | | | | | | | | |
|---------------|-------|------|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----------|--|
| μM | BAP | | CIN | | 2 iP | | TDZ | | | | Média (%) | |
| 0 | 0,00 | b B | 0,00 | b B | 0,00 | b B | 0,00 | c B | 0,00 | c B | 0,00 | |
| 5 | 0,70 | a AB | 0,10 | b B | 1,13 | a A | 0,77 | b A | 0,67 | b A | 0,67 | |
| 10 | 1,05 | a A | 0,00 | b B | 1,27 | a A | 1,53 | a A | 0,96 | a A | 0,96 | |
| Média (%) | 0,58 | | 0,03 | | 0,80 | | 0,76 | | | | 0,54 | |
| CV (%) | 23,20 | | | | | | | | | | | |

* médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado.

Para *Cedrela fissilis* (cedro), em estudo sobre o efeito de BAP, em concentrações de 0 a 5 μM , combinado ou não com 0,5 μM de ANA ou AIB, sobre a indução de brotações múltiplas, o número de brotações por explante não aumentou com a adição somente de citocinina. No entanto, nos meios que continham auxina, o número de brotações aumentou com o aumento das concentrações de BAP (AMARAL, 2006). Mantovani et al. (1999) também observaram que tratamentos

contendo 1 mg L⁻¹ de BAP (4,4 µM) proporcionaram maior número de brotações em *Didymopanax morototoni* (caixeta), bem como melhor desenvolvimento e maior tamanho de folhas quando comparados àqueles com TDZ, aos 30 dias, em meio WPM. A superioridade de BAP em relação à TDZ também foi verificada para *Cordia trichotoma* (louro-pardo), em que BAP proporcionou maior número de brotos por explante e também maior comprimento de brotações quando comparado à TDZ, em meio WPM suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de ANA (0,5 µM) e GA₃ (1,44 µM) (MANTOVANI et al., 2001).

Em *Rubus* sp. (amoreira-preta), cultivar Ébano, foram obtidos brotos mais alongados, com 1,0 mg L⁻¹ (4,4 µM) de BAP, 0,001 mg L⁻¹ (0,005 µM) de ANA; a adição de GA₃ ao meio nutritivo com 1,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,001 mg L⁻¹ de ANA resultou em significativo aumento no número de brotos por gema (PASQUAL et al., 1991).

Para explantes que formaram calos houve interação entre as concentrações e citocininas testadas (p=0,0147), bem como efeito significativo dos fatores principais, ambos com valores de p=0,000. O mesmo foi observado para clorose foliar, obtendo-se valores de “p” de 0,0002 e 0,000 para interação e para os fatores principais, respectivamente. A interação indicou que, dependendo da citocinina a ser utilizada, ocorrem mudanças na resposta dos epicótilos à formação de calos e à ocorrência de clorose foliar, à medida que se altera a concentração de citocinina. Os resultados podem ser observados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Na ausência de citocininas ocorreu reduzida formação calogênica, a qual, de maneira geral, aumentou com o incremento nas concentrações, de maneira semelhante ao que foi observado em *Cedrela fissilis* (cedro) por Amaral (2006), o que sugere que concentrações mais elevadas de citocininas intensificam a calogênese em segmentos apicais caulinares de *Peltophorum dubium*. Para BAP, 2iP e TDZ, 5 e 10 µM não diferiram entre si, diferindo apenas da ausência de citocininas. Para CIN, 5 e 10 µM também não diferiram entre si, no entanto, 5 µM não diferiu da ausência de citocininas. Para uma mesma concentração utilizada, as citocininas 2iP e TDZ apresentaram os piores resultados, com formação calogênica em torno de 90% dos explantes, o que prejudicou o desenvolvimento das brotações emitidas. Villa et al. (2010) observaram maior intensidade de calogênese em segmentos nodais de *Rubus* sp. cultivados em meios suplementados com 2 e 4 mg

L⁻¹ (8,8 e 17,6 µM) de BAP. Em *Cedrela fissilis* (cedro), a adição de ANA ao meio nutritivo suplementado com 1,25 a 5,0 µM de Benziladenina (BA) estimulou a formação de calos, bem como causou inibição significativa na proliferação de gemas e no crescimento (NUNES et al., 2002).

Tabela 3 – Formação calogênica (%CALOS) em epicótilos de *Peltophorum dubium* (Sprenkel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de 0,015 µM de ANA e de diferentes concentrações de BAP, CIN, 2iP ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

| %CALOS | | | | | | | | | | | |
|-----------|-------|------|-------|------|-------|-----|-------|-----|-----------|-------|--|
| µM | BAP | | CIN | | 2 iP | | TDZ | | Média (%) | | |
| 0 | 13,20 | a *A | 13,20 | a A | 13,20 | a A | 13,20 | a A | 13,20 | 13,20 | |
| 5 | 63,20 | b AB | 33,00 | ab A | 89,90 | b B | 90,00 | b B | 69,02 | 69,02 | |
| 0 | 56,50 | b A | 53,00 | b A | 93,20 | b B | 96,60 | b B | 74,82 | 74,82 | |
| Média (%) | 44,30 | | 33,07 | | 65,43 | | 66,60 | | 52,35 | | |
| CV (%) | 15,52 | | | | | | | | | | |

* médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado.

A clorose foliar ocorreu somente em epicótilos cultivados em meio nutritivo com a presença de citocininas, exceto de CIN, em que em nenhuma das concentrações testadas foi observado folhas com aspecto clorótico (Tabela 4). TDZ diferiu das demais citocininas, que, por sua vez, não diferiram entre si. As concentrações de TDZ utilizadas promoveram altas porcentagens de brotações apresentando clorose foliar. Observou-se que, nesses tratamentos, o desenvolvimento das brotações foi muito prejudicado e a ocorrência de clorose foliar associada à intensa formação de calos na base inviabilizou a posterior utilização das brotações adventícias emitidas (Figura 2 – B e C). Efeito semelhante foi observado por Correia e Graça (1995), os quais indicaram que a multiplicação de *Acacia mearnsii* (acácia-negra) pode ser obtida na presença de 13,32 µM de BA e

0,245 μM de AIB, mas o processo de micropropagação foi limitado pela ocorrência de clorose foliar, seguida da necrose da planta e baixa taxa de multiplicação.

Tabela 4 – Brotações de epicótilos de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert que apresentaram clorose foliar *in vitro* (%CF), aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de 0,015 μM de ANA e de diferentes concentrações de BAP, CIN, 2iP ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

| μM | %CF | | | | | | | | | | Média (%) |
|---------------|-------|-----|------|-----|-------|-----|-------|-----|------|-----|-----------|
| | BAP | | CIN | | 2 iP | | TDZ | | | | |
| 0 | 0,00 | a A | 0,00 | a A | 0,00 | a A | 0,00 | a A | 0,00 | a A | 0,00 |
| 5 | 10,00 | a A | 0,00 | a A | 30,00 | a A | 70,00 | b B | | | 27,50 |
| 10 | 30,00 | a A | 0,00 | a A | 20,00 | a A | 90,00 | b B | | | 35,00 |
| Média (%) | 13,33 | | 0,00 | | 16,67 | | 53,33 | | | | 20,83 |
| CV (%) | | | | | | | | | | | 19,04 |

* médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado.

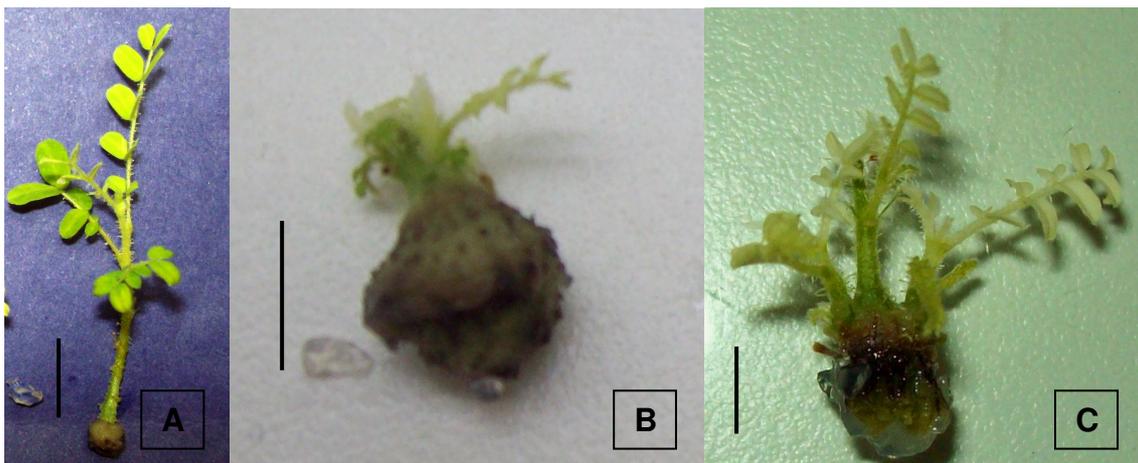


Figura 2 - Aspecto das brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, após 30 dias de cultivo *in vitro* de epicótilos em meio nutritivo MS suplementado com 0,015 μM de ANA na ausência de citocininas (A) e na presença de TDZ, com formação de calos na base (B) e clorose foliar (C). Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

3.3.2 Efeito de citocininas na multiplicação *in vitro* de epicótilos contendo o nó cotiledonar de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

No caso das variáveis sobrevivência, emissão de brotações adventícias e número de brotos por explante não houve interação significativa ($p=0,4909$; $p=0,8080$ e $p=0,3914$ respectivamente), efeito das concentrações ($p=0,6444$; $p=0,7870$ e $p=0,8379$) e nem das citocininas testadas ($p=0,4131$; $p=0,9862$ e $p=0,2318$) indicando que os fatores testados não interferiram nessas respostas obtidas.

Na sobrevivência observou-se uma média geral de 98,6% enquanto que 75,31% dos explantes emitiram brotações adventícias, sendo possível obter-se, em média, 2,05 brotações adventícias por explante. Tais resultados são semelhantes aos obtidos no experimento anterior na presença de TDZ. No entanto, no presente experimento, foram utilizados epicótilos contendo ainda os nós cotiledonares das plântulas germinadas *in vitro*. Este tipo de explante foi utilizado, neste experimento, em virtude da observação de que a manutenção dos nós cotiledonares junto aos epicótilos é benéfica à emissão de novas brotações adventícias e ao desenvolvimento de gemas preexistentes, diferentemente do que foi observado quando apenas os epicótilos foram utilizados. Em *Parapiptadenia rigida* (angico-vermelho) foram obtidos resultados mais satisfatórios com o emprego de segmentos cotiledonares quando comparados aos segmentos nodais. Para os segmentos cotiledonares, a adição de BAP promoveu a formação de brotações múltiplas, principalmente na concentração $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ($4,4 \text{ } \mu\text{M}$), enquanto que, em segmentos nodais, este evento não ocorreu (KIELSE et al., 2009).

No presente experimento, além da utilização de epicótilos contendo os nós cotiledonares, foi retirada a auxina ANA do meio nutritivo e foi acrescentado 1 g L^{-1} de carvão ativado, o que contribuiu para melhorar o vigor das partes aéreas regeneradas e o desenvolvimento das brotações, uma vez que estas não mais se apresentaram com clorose foliar e nem malformadas. As brotações de *Cercis canadensis* var. *mexicana* ("mexican redbud") em meios nutritivos suplementados com 2iP, CIN ou TDZ apresentaram excessivo amarelecimento das folhas e necrose nas concentrações mais elevadas desses fitorreguladores. A adição de carvão ativado ao meio nutritivo reduziu a clorose e o crescimento de calos nas brotações

(MACKAY et al., 1995). Da mesma forma, Quoirin et al. (2001), trabalhando com segmentos de epicótilos de *Acacia mearnsii* (acácia-negra) contendo uma gema axilar, conseguiram reduzir a clorose foliar das brotações (de 64,1% para 31,0%) com a adição de carvão ativado ao meio nutritivo.

Para a formação de calos não houve interação ($p=0,8858$) nem efeito das citocininas testadas ($p=0,6920$), sendo observado efeito somente do fator principal concentrações de citocininas ($p=0,0245$). No que se refere à porcentagem de vitrificação, observou-se o mesmo resultado, com valores de “p”, respectivamente, de 0,4355; 0,2582 e 0,0106. Esses resultados indicam que a citocinina utilizada não interfere na formação calogênica e na ocorrência de vitrificação; o que vai ser determinante para essas variáveis é a concentração em que essa classe de fitorreguladores é adicionada ao meio nutritivo.

A calogênese na base dos explantes apresentou um ajuste linear crescente em relação às concentrações de citocininas testadas. A maior concentração utilizada (15 μM) promoveu a maior intensidade de formação de calos (Figura 3). No entanto, a formação de calos no presente experimento foi bem inferior àquela obtida no experimento anterior, em que o carvão ativado não estava presente no meio nutritivo. Na ausência de carvão ativado, foram obtidos níveis acima de 90% nos tratamentos com 2iP e TDZ, até a concentração de 10 μM ; já no presente experimento, com a presença de carvão ativado, esses níveis não passaram de 20%, até a concentração de 15 μM . Observou-se, ainda, que os calos formados na presença de carvão ativado foram bem menores e não prejudicaram o desenvolvimento das brotações, como observado no experimento anterior. Nesse caso, estabeleceu-se um balanço mais adequado entre auxina/citocinina .

Na indução e crescimento de gemas axilares a partir de segmentos contendo nós cotiledonares de *Cedrela fissilis* (cedro), a formação de calos na base dos explantes mostrou ser diretamente proporcional à adição de citocinina, ou seja, quanto maior a concentração utilizada (até 5 μM), maior a porcentagem de formação de calos (AMARAL, 2006). Em segmentos nodais de *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* (videira) houve formação de calos em 100% dos explantes na presença das citocininas BAP e CIN em concentrações que variaram de 2,5 a 10 μM ; na ausência de citocininas não se verificou formação de calo (MACHADO et al., 2006).

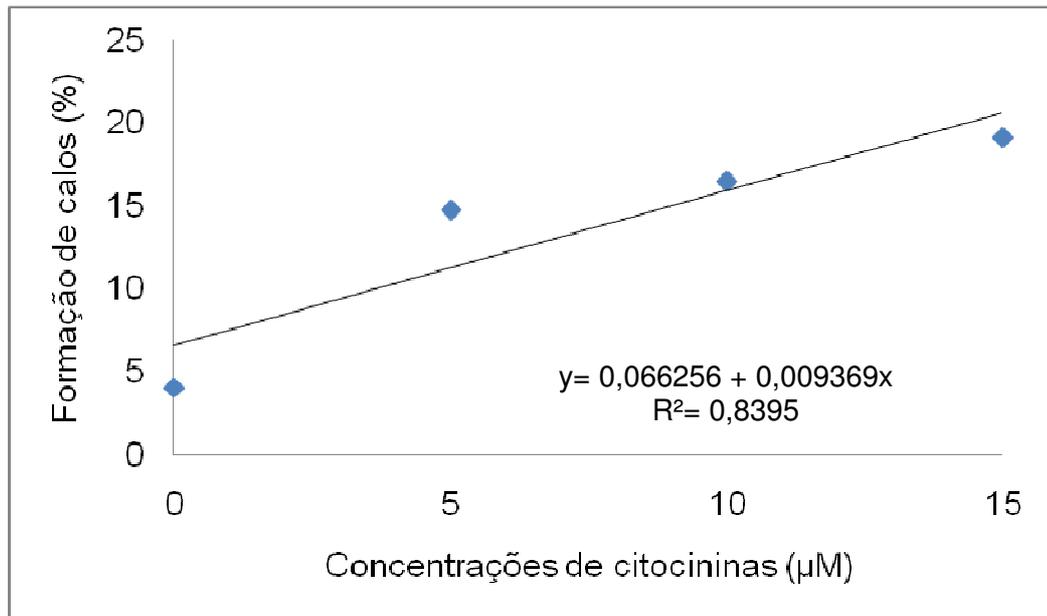


Figura 3 – Formação calogênica (%) em epicótilos contendo nós cotiledonares de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de diferentes concentrações de BAP, CIN, 2iP ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Para a porcentagem de plantas que apresentaram vitrificação observou-se um comportamento quadrático em relação às concentrações de citocininas (Figura 4). Na ausência de citocininas não foram observadas plantas com aspecto vítreo e, à medida que se aumentou a concentração destes reguladores a ocorrência de vitrificação tornou-se maior, sendo que o máximo seria verificado a 21,5 µM, conforme o cálculo de máxima eficiência técnica (MET). Deste ponto em diante, seria observado um decréscimo na ocorrência de vitrificação. A vitrificação (ou hiperhidricidade) caracterizou-se pelo aspecto vítreo das folhas, as quais apresentaram um enrolamento e mostraram-se bastante frágeis ao toque, quebrando-se facilmente. A vitrificação é uma das principais anomalias que têm recebido atenção especial nos últimos anos, tendo sido observada a interação simultânea de diversos fatores interferindo nas principais vias metabólicas das plantas, como fotossíntese, respiração e transpiração. Os eventuais fatores da vitrificação têm sido atribuídos ao potencial osmótico, concentração dos reguladores de crescimento, especialmente as citocininas, umidade e a concentração salina do meio nutritivo. O mecanismo de ação da citocinina no processo da vitrificação é

pouco compreendido. Talvez essa classe de fitorreguladores induza a uma súbita atividade celular, o que em um meio com alto potencial hídrico e/ou uma atmosfera de elevada umidade relativa no interior dos frascos resultaria em novas células que, logo, se turgiriam (CUZZUOL et al., 1995).

Em *Didimopanax morototoni* (caixeta), 10 mg L⁻¹ de BAP foi responsável pela ocorrência de vitrificação, evidenciada por brotações atípicas com entrenós curtos e folhas curvadas, espessas, quebradiças e de tamanho reduzido. Estes sintomas são provocados por desordens fisiológicas, que ocorrem com frequência na cultura *in vitro* de muitas espécies, e são atribuídas principalmente ao excesso de citocininas nos meios nutritivos (MANTOVANI et al., 1999).

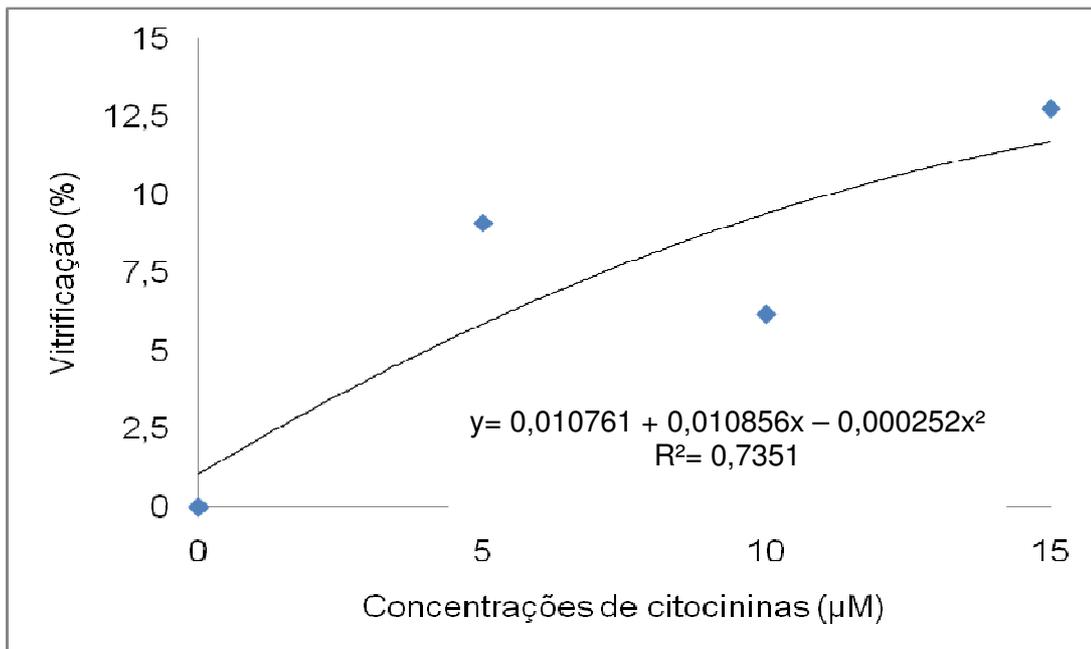


Figura 4 – Vitrificação em epicótilos contendo nós cotiledonares, de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de diferentes concentrações de BAP, CIN, 2iP ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

No que se refere ao comprimento de brotações, não houve interação ($p=0,9102$) nem efeito do fator principal citocininas. Somente o efeito das concentrações foi significativo ($p=0,0064$) indicando que a citonina utilizada não interfere no tamanho das brotações (Figura 6). Na concentração de 5 µM foi

observado comprimento um pouco inferior que nas demais concentrações e na ausência de citocininas que, por sua vez, apresentaram resultados semelhantes. O menor comprimento de brotações seria obtido a 8,5 μM , de acordo o cálculo de MET. Pôde-se observar que, em geral, os maiores comprimentos de brotações ocorreram nos tratamentos em que houve menor emissão de brotações adventícias. Nos tratamentos em que foi observado maior número de brotações adventícias, estas apresentavam-se bastante próximas e de tamanho reduzido. Seria necessário um período adicional de cultivo, com transferência para um novo meio nutritivo, para propiciar o seu desenvolvimento.

Nos tratamentos em que o número de brotações adventícias foi menor houve maior desenvolvimento da parte aérea (Figura 5 – A). Foram observados casos em que, além do ápice (Figura 5 – B), ou com a necrose do ápice (Figura 5 – C), as gemas preexistentes no nó cotiledonar se desenvolveram, permitindo, também, a utilização de segmentos nodais para multiplicação da espécie. Nos tratamentos em que se observou maior emissão de brotações adventícias, estas apresentavam-se, em alguns casos, com bom desenvolvimento (Figura 5 – D) e, em outros, ainda com tamanho reduzido (Figura 5 – E).

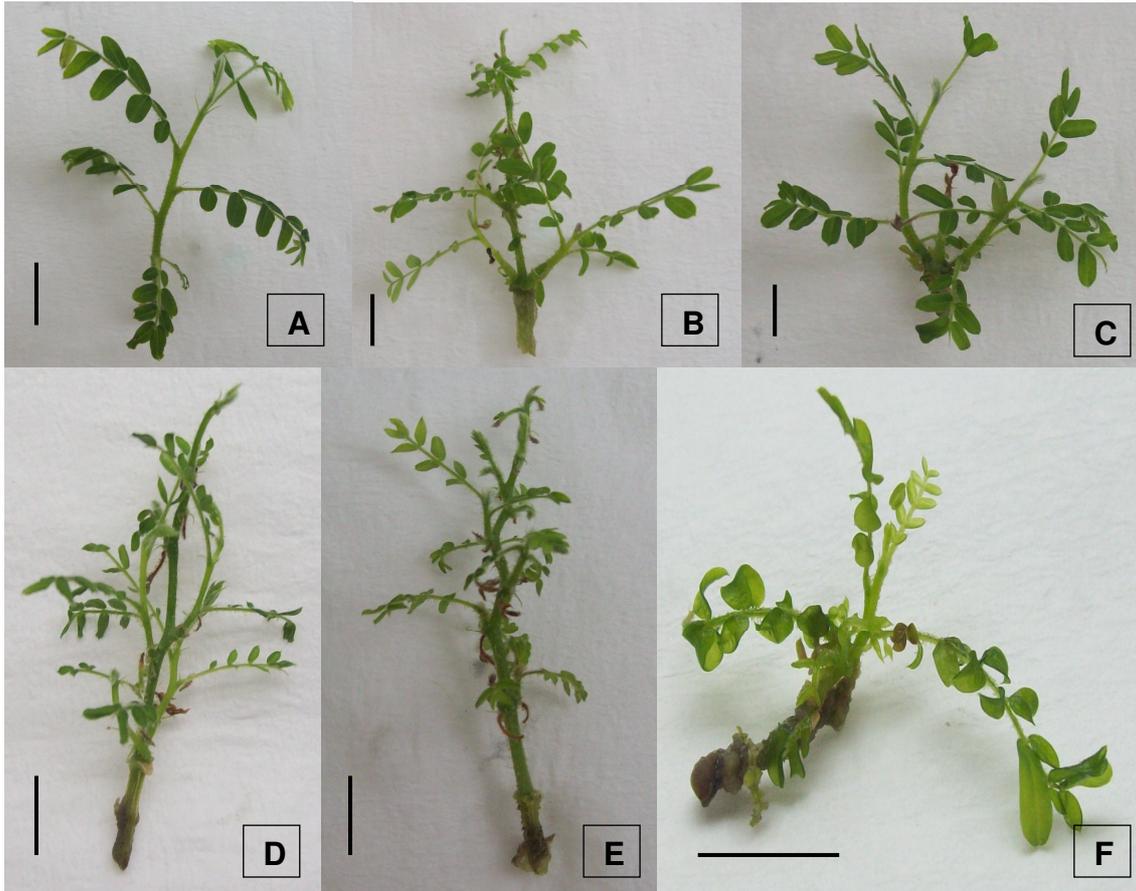


Figura 5 – Padrões de desenvolvimento observados em epicótilos, contendo nós cotiledonares, de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS. Observa-se em “A” somente o ápice desenvolvido, em “B” ápice e gemas (preexistentes no nó cotiledonar) desenvolvidas, em “C” necrose do ápice e gemas (preexistentes no nó cotiledonar) desenvolvidas, em “D” bom desenvolvimento de brotações adventícias, em “E” desenvolvimento de brotações adventícias curtas e, em “F”, vitrificação. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Em relação ao comprimento médio das brotações e número de gemas, nenhum efeito significativo do acréscimo de BAP no meio nutritivo foi observado em brotações de porta-enxerto de *Prunus* sp, cultivadas em meio MS com $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,3 \text{ } \mu\text{M}$) de AIB e concentrações de BAP de $0,0$; $0,4$; $0,8$ e $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ (0 a $5,3 \text{ } \mu\text{M}$) (ROCHA et al., 2009).

As citocininas podem favorecer o alongamento de brotos; contudo, é necessário que se adicione ao meio a concentração adequada, sendo esta específica para cada espécie (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). VICENTINI

(1995) obteve brotações de *Ocotea porosa* (imbuia) com até 4,3 cm de comprimento em meio MS acrescido de 3,23 μM de BAP. Villa et al. (2006) observaram maior comprimento médio de brotos (7,87 cm) de *Rubus idaeus* (amoreira-preta) com 1,0 mg L^{-1} (4,4 μM) de BAP em meio WPM com o dobro da sua concentração de sais. Na multiplicação de *Cabralea canjerana* (canjerana), ROCHA (2005) obteve brotações com comprimento inferior a 1 cm, e estas apresentaram pouca alteração em relação ao comprimento no decorrer dos subcultivos, o que pôde ser observado, também, no presente trabalho, em que o comprimento médio das brotações adventícias, nos diferentes tratamentos, também apresentou pouca variação. Em segmentos cotiledonares de *Parapiptadenia rigida* (angico-vermelho), o maior tamanho médio de brotos (0,43 cm) foi observado à 0,5 mg L^{-1} , independentemente da citocinina utilizada (KIELSE et al., 2009).

Da mesma forma que foi observado para o comprimento de brotações, sobre o número de folhas por explante (NF) não houve interação dos fatores principais ($p=0,5793$) nem efeito do fator principal citocininas ($p=0,5822$). Somente as concentrações de citocininas utilizadas tiveram efeito significativo ($p=0,0008$) apresentando comportamento quadrático (Figura 7). Inicialmente, com o aumento das concentrações houve aumento no número de folhas por explante, sendo que o máximo seria obtido a 20,2 μM de acordo com o cálculo de MET, decrescendo deste ponto em diante. Isso permite inferir que a utilização das citocininas estimulou a formação de maior número de brotos, porém de tamanho reduzido e, conseqüentemente, apresentando menor número de segmentos nodais e folhas.

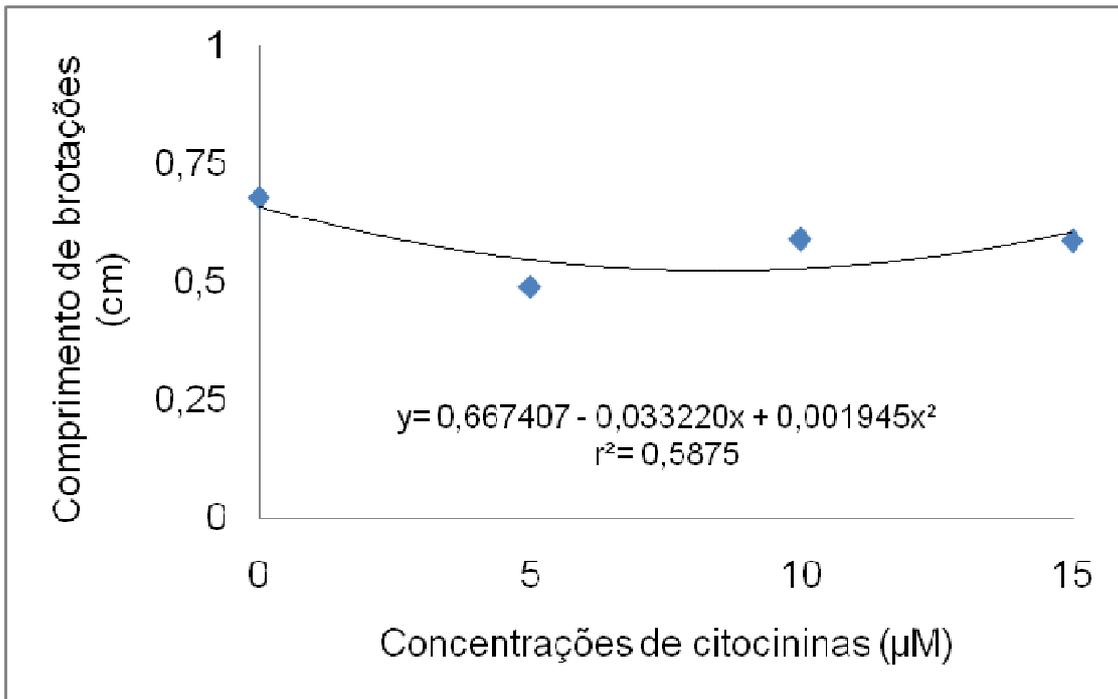


Figura 6 – Comprimento de brotações emitidas em epicótilos contendo nós cotiledonares, de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de diversas concentrações de BAP, CIN, 2iP ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Para *Diospyrus kaki* (caqui), também foi verificado comportamento quadrático do número de folhas em relação às concentrações de citocininas testadas, em que o aumento na concentração de citocininas promoveu um aumento no número de folhas, até atingir o máximo (2,6 folhas por explante) com 12,48 µM de 2iP (TELLES; BIASI, 2005). Em *Rubus* sp (amoreira) o maior número de folhas foi observado quando foram adicionados, ao meio MS, 2 ou 4 mg L⁻¹ de BAP (8,8 ou 17,6 µM) (VILLA et al., 2010). Para um híbrido do gênero *Vitis* (videira), BAP apresentou resultados inferiores (em torno de 4 folhas por explante) em relação ao tratamento testemunha (6 folhas por explante), tendo efeito negativo, também, na altura das brotações, sendo mais evidente nas maiores concentrações testadas (5 e 10 µM) (MACHADO et al., 2006).

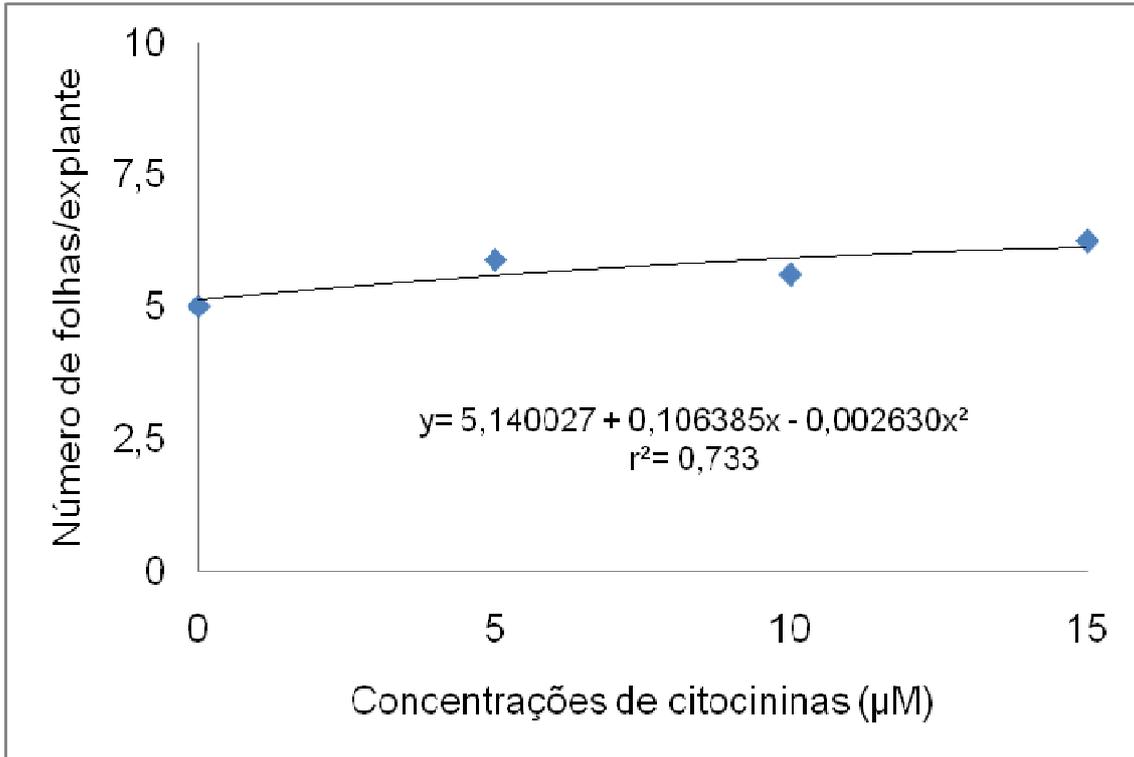


Figura 7 – Número de folhas emitidas em epicótilos contendo o nó cotiledonar, de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de diferentes concentrações de BAP, CIN, 2iP ou TDZ. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

3.3.3 Efeito de BAP, isolado ou em combinação com outras citocininas, na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Para a sobrevivência não houve interação ($p=0,7262$) nem efeito dos fatores principais concentrações ($p=0,3798$) e citocininas ($p=0,5738$). Foi observada uma elevada média geral de 94,4% indicando que estes fatores não interferiram na sobrevivência dos explantes.

Para os explantes que formaram calo não houve interação ($p=0,1798$) nem efeito do fator principal citocininas ($p=0,1876$). Apesar de não ter ocorrido diferenças significativas a uma probabilidade de erro de 5%, aceitando-se uma probabilidade de erro um pouco superior ($p=0,0558$), seriam observadas diferenças estatísticas para as concentrações de citocininas que foram combinadas com BAP. Na presença de BAP isolado (ausência de CIN ou 2iP) não houve formação de calos, mas à medida

que outra fonte de citocinina foi adicionada ao meio nutritivo, este evento começou a ocorrer (Tabela 5), provavelmente pela alteração na relação auxina/citocinina que se estabeleceu nos explantes.

Para os explantes que emitiram brotações adventícias não houve interação ($p=0,3636$) nem efeito do fator principal citocininas ($p=0,3145$). Houve diferença significativa ($p=0,0134$) para as concentrações testadas, sendo que 5 e 10 μM não diferiram entre si, apenas da concentração 0 μM , em que apenas BAP estava presente a 5 μM (Tabela 5). Quando BAP foi utilizado, isoladamente, no meio nutritivo não houve emissão de brotações adventícias. No entanto, quando foi acrescentado CIN ou 2iP, a 5 ou 10 μM , houve aumento na emissão de brotações adventícias, indicando que a associação de citocininas estimulou a emissão de brotações adventícias.

Em segmentos nodais de *Cabralea canjerana* (canjerana), cultivados em meio MS, as maiores porcentagens de explantes com brotos (25 a 27%) ocorreram na presença de BAP isolado (a 2,5 μM) ou combinado com 2iP (2,5 μM BAP + 2,5 μM 2iP), o que permitiu a obtenção de 25 a 27% de explantes com brotações adventícias (ROCHA et al., 2007). Quando as duas citocininas estavam presentes, também proporcionaram o maior número médio de brotos por explante (1,63). No entanto, as taxas de multiplicação de brotos foram relativamente baixas (menores que 2,00) em comparação àquelas obtidas em outras espécies na presença de citocininas.

BAP isolado ou em combinação com outras citocininas induz a organogênese a partir de ápices caulinares de *Macrotyloma uniflorum* (dólico) (SHAMSUDEEN VARISAI et al., 1999). Segundo esses autores, números maiores de brotos múltiplos foram desenvolvidos a partir de nós cotiledonares em meio nutritivo MS contendo BAP combinado com CIN ou 2iP. Além disso, os brotos múltiplos desenvolvidos com uma combinação de BAP (4,4 μM) e 2iP (14,7 μM) cresceram mais rápido que aqueles cultivados com BAP isolado (4,4 μM). Para *Ocotea porosa* (imbuia), cultivada em meio nutritivo MS combinando BAP e CIN, observou-se que, no cultivo inicial, a taxa de multiplicação aumentou até a combinação de concentrações de 5 μM de BAP e 5 μM de CIN, obtendo 2,3 brotações por explante. Quando BAP foi testado isolado, a taxa média de multiplicação foi maior (5,3) do que quando combinado com CIN (PELEGRINI, 2008).

Tabela 5 - Formação calogênica (%calos) e emissão de brotações adventícias (%EBA) em epicótilos de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de 5 μ M de BAP, isolado ou combinado com diversas concentrações de CIN ou 2iP. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

| μ M | %CALOS | | % EBA | |
|-----------|--------|----|-------|---|
| 0 | 0,00 | a* | 0,00 | b |
| 5 | 16,50 | b | 19,25 | a |
| 10 | 5,50 | ab | 16,50 | a |
| Média (%) | 7,33 | | 11,92 | |
| CV (%) | 12,66 | | 12,42 | |

* médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado.

Em segmentos nodais de *Swietenia macrophylla* King (mogno) foram obtidas altas taxas de multiplicação (7,22 brotos por segmento) em meio nutritivo MS contendo 10 μ M de BAP e 2,2 μ M de 2iP. Em meio nutritivo QL, combinações de BAP (0 a 20 μ M) e 2iP (2,2 μ M) não induziram a multiplicação de brotos (SCHOTTZ et al., 2007).

3.4 Conclusões

- Não ocorre emissão de brotações adventícias na ausência de citocininas em epicótilos de *Peltophorum dubium*, mas, no momento em que estas são adicionadas ao meio nutritivo, induzem respostas nos explantes.
- As citocininas 2iP e TDZ, combinadas com ANA, promovem acréscimo na emissão de brotações adventícias em epicótilos de *Peltophorum dubium*. No entanto, as brotações apresentam pequeno desenvolvimento, intensa formação de calos na base do explante e clorose foliar, o que inviabiliza a utilização dessas brotações.

- As citocininas, nas concentrações de 5 e 10 μM , promovem alta formação de calos na base de epicótilos.
- Na ausência de citocininas não ocorre clorose foliar. Com a utilização de TDZ, a 10 μM , observa-se clorose foliar em até 90% dos explantes, prejudicando o desenvolvimento dos mesmos.
- A utilização de epicótilos contendo nós cotiledonares eleva a emissão de brotações adventícias para 75% em relação à utilização somente de epicótilos.
- O acréscimo de carvão ativado no meio nutritivo e a exclusão de ANA proporcionam a obtenção de brotações mais vigorosas e sem clorose foliar, bem como reduzem a calogênese na base dos explantes.
- Na ausência de citocininas observa-se maior comprimento de brotações.
- Quando BAP é utilizado isoladamente no meio nutritivo, a 5 μM , não ocorre emissão de brotações adventícias. Combinações de BAP com 5 ou 10 μM de CIN ou 2iP promovem a emissão de novas brotações.

4 CAPÍTULO II

EFEITO DE MEIOS NUTRITIVOS E AUXINAS NA FORMAÇÃO *in vitro* DE RAÍZES DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

4.1 Objetivo

Este trabalho objetivou testar o efeito de meios nutritivos, fontes e concentrações de auxinas, bem como a utilização de tratamentos “pulse” com esta classe de fitorreguladores na formação *in vitro* de raízes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert.

4.2 Material e Métodos

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da UFSM, em Santa Maria, RS.

As sementes foram coletadas e armazenadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro/Florestas em Santa Maria, RS, e são provenientes da produção de 2005. Na UFSM, permaneceram armazenadas em frascos de vidro contendo sílica gel e acondicionadas sob temperatura de 8-10^o C até o seu emprego em experimentos.

4.2.1 Obtenção das brotações

Inicialmente, as sementes foram submetidas à superação de dormência através de escarificação mecânica com lixa nº 100 na região oposta ao embrião. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas superficialmente em solução de etanol a 70% (v/v) por 30 segundos e, após, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2 % (v/v) por 15 minutos, passando, então, por triplo enxágue em água destilada e autoclavada.

Visando a germinação *in vitro*, as sementes foram inoculadas, sob câmara de fluxo laminar, em frascos de vidro com capacidade para 150 ml, contendo 30 ml de meio ágar-água a 0,7% (p/v), previamente autoclavados por um período de 40 minutos a 120 °C e 1 atm. Em cada frasco foram colocadas três sementes. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3 °C e fotoperíodo de 16 h com intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias do tipo luz do dia.

No estabelecimento *in vitro* foram utilizados epicótilos com, aproximadamente, 8 a 10 mm de comprimento, isolados das plântulas germinadas *in vitro* após 15 dias de cultivo, obtidas como anteriormente descrito. O meio nutritivo consistiu de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar e 1 g L⁻¹ de carvão ativado. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado por 15 minutos a 120°C e a 1 atm. Sob câmara de fluxo laminar, os epicótilos, em número de três, foram inoculados em frascos de vidro com capacidade para 150 ml contendo 30 ml de meio nutritivo. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3 °C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias do tipo luz do dia.

Decorridos 30 dias de cultivo, as brotações (epicótilos já estabelecidos) foram utilizados nos trabalhos de formação *in vitro* de raízes descritos a seguir.

4.2.2– Efeito do meio nutritivo e de AIB na formação *in vitro* de raízes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Brotações obtidas em condições assépticas com 30 dias de cultivo (como descrito no item 4.2.1), contendo de 1 a 3 pares de folhas constituíram as unidades amostrais. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema trifatorial 2x2x2. Os tratamentos consistiram de 0 ou 10 μM (ausência ou presença) da auxina Ácido 3-Indol Butírico (AIB), em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) ou WPM (“Wood Plant Medium” – LLOYD; MCCOWN, 1981), e das avaliações realizadas aos 30 e aos 60 dias de cultivo, totalizando oito tratamentos de oito repetições cada. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro de 150 ml contendo 30 ml de meio nutritivo e três brotações.

Foi utilizado o meio nutritivo conforme o tratamento, acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 7 g L^{-1} de ágar e 1 g L^{-1} de carvão ativado. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão por 15 minutos. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3 °C e fotoperíodo de 16 h com intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias do tipo luz do dia.

Após 30 dias de cultivo, as brotações foram transferidas para meio nutritivo com a mesma constituição, porém solidificado com 6 g L^{-1} de ágar, permanecendo neste meio por um período adicional de 30 dias. Nas brotações que apresentaram intensa formação de calos na base, foi realizada a sua remoção com o intuito de não prejudicar a formação *in vitro* de raízes. As variáveis analisadas foram: sobrevivência das brotações (%SOB), brotações que formaram calo (%CALO), brotações que apresentaram vitrificação (%VITRIF) e formação *in vitro* de raízes (%RAIZ), todas expressas em porcentagem.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi

significativo, foi utilizado, para a comparação das médias o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Quando houve interação entre os níveis dos fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000).

4.2.3 Efeito do tipo e concentração de auxinas na formação de raízes *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Brotações obtidas em condições assépticas com 30 dias de cultivo (como descrito no item 4.2.1), contendo de 1 a 3 pares de folhas constituíram as unidades amostrais. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema trifatorial 3x5x2, com cinco repetições. Os tratamentos consistiram das auxinas ANA, AIB ou Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), nas concentrações 0, 5, 10, 15 ou 20 μM e das avaliações aos 30 e aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro de 150 ml contendo 30 ml de meio nutritivo e três brotações.

Foi utilizado o meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 7 g L^{-1} de ágar e 1 g L^{-1} de carvão ativado. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão por 15 minutos. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3 °C e fotoperíodo de 16 h com intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Após 30 dias de cultivo, as brotações foram transferidas para meio nutritivo fresco com a mesma constituição, porém solidificado com 6 g L^{-1} de ágar, permanecendo neste meio por um período adicional de 30 dias. Nas brotações que apresentaram intensa formação de calos na base, foi efetuada a remoção destas estruturas com o intuito de não prejudicar a formação *in vitro* de raízes. As variáveis analisadas foram: sobrevivência das brotações (%SOB), brotações que formaram calo (%CALO), brotações que apresentaram vitrificação (%VITRIF) e formação *in vitro* de raízes (%RAIZ), todas expressas em porcentagem.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi utilizado, para a comparação das médias o teste de Scott-Knott ou de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, para tratamentos qualitativos, e análise de regressão polinomial, para tratamentos quantitativos. Quando houve interação entre os níveis dos fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000).

4.2.4 Efeito do meio nutritivo e tratamentos “pulse” de AIB na indução e desenvolvimento *in vitro* de raízes em *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Brotações estabelecidas em condições assépticas com 30 dias de cultivo (como descrito no item 4.2.1), contendo de 1 a 3 pares de folhas constituíram as unidades amostrais. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2x2, com nove repetições. Os tratamentos consistiram das concentrações 0, 5, 10, 15 ou 20 μM da auxina AIB, em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) ou WPM (“Wood Plant Medium” – LLOYD; McCOWN, 1981), avaliados aos 30 e aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro de 150 ml contendo 30 ml de meio nutritivo e três brotações.

Para a fase de indução de raízes *in vitro* foi utilizado o meio completo e concentração de AIB, conforme o tratamento, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 6 g L⁻¹ de ágar e 1 g L⁻¹ de carvão ativado. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão por 15 minutos. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3 °C, no escuro, por um período de seis dias, constituindo o tratamento “pulse”.

Para a fase de desenvolvimento de raízes foi utilizado o meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) ou WPM (“Wood Plant Medium” – LLOYD; McCOWN, 1981), conforme os tratamentos iniciais, porém reduzidos à metade das suas concentrações de sais (MS/2 ou WPM/2) e na ausência da auxina. Foram utilizados 30 g L⁻¹ de sacarose, 50 mg L⁻¹ de mio-inositol, 6 g L⁻¹ de ágar e 1 g L⁻¹ de carvão ativado. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão por 15 minutos. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3 °C e fotoperíodo de 16 h com intensidade luminosa de 20 μmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Após 30 dias de cultivo, as brotações foram transferidas para meio nutritivo fresco com a mesma constituição, permanecendo neste meio por um período adicional de 30 dias. Nas brotações que apresentaram intensa formação de calos na base, houve remoção destas estruturas com o intuito de não prejudicar a formação *in vitro* de raízes. As variáveis analisadas foram: sobrevivência das brotações (%SOB), brotações que formaram calo (%CALO), brotações que apresentaram vitrificação (%VITRIF) e formação *in vitro* de raízes (%RAIZ), todas expressas em porcentagem.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, foi utilizado, para a comparação das médias o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro, para tratamentos qualitativos, e análise de regressão polinomial, para tratamentos quantitativos. Quando houve interação entre os níveis dos fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Efeito do meio nutritivo e de AIB na formação *in vitro* de raízes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Em relação à sobrevivência e vitrificação, não houve diferença significativa para os fatores testados, indicando que os mesmos não tiveram efeito sobre estas variáveis. No que se refere à sobrevivência foi observada uma elevada média geral, de 98,58%, e, para vitrificação, a média foi reduzida (1,38%).

Quanto à formação de calos houve efeito significativo para o período de avaliação ($p=0,000$) e houve interação ($p=0,0228$) dos fatores principais concentração de AIB e meio nutritivo (Tabela 6). Aos 30 dias de cultivo foi observada uma média de 54,8% de formação de calos na base das brotações e, aos 60 dias, essa média caiu para 3,0%, o que é mais favorável à formação de raízes. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que, aos 30 dias, no momento da transferência das brotações para um meio nutritivo fresco, o excesso de calo na base foi retirado com o intuito de não prejudicar a formação de raízes, que era o objetivo do presente trabalho. Como, provavelmente, os teores endógenos de hormônios diminuíram após esse período de cultivo, a formação de calos não voltou a ocorrer. Para AIB foram observadas diferenças significativas apenas para o meio nutritivo MS. A maior formação de calos foi observada na presença de AIB (10 μM), enquanto que, no meio WPM, isso ocorreu na ausência desta auxina.

Para a formação de raízes, houve interação ($p=0,0494$) dos fatores principais AIB e meio nutritivo, indicando que o meio nutritivo utilizado interfere na necessidade de utilização ou não de AIB. Foi observada a formação de raízes na presença de AIB para o meio MS, a qual não pode ser considerada satisfatória, em virtude do reduzido valor (Tabela 7). Já no meio nutritivo WPM foi observada formação de raízes na ausência de AIB (Tabela 7). Pôde-se observar que, além do baixo índice de formação de raízes observado, as raízes sempre foram muito pequenas (até 5 mm) e ocorreram juntamente com calos, apresentando, ainda, em alguns casos, sinais de necrose.

Tabela 6 – Formação de calos (%) em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo MS ou WPM, na presença ou ausência de AIB. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

| %CALOS | | | | | |
|-----------------------|-------|---|-------|---|-----------|
| AIB (μM) | MS | | WPM | | Média (%) |
| 0 | 19,86 | a | 39,27 | b | 28,07 |
| 10 | 42,18 | b | 27,00 | b | 34,59 |
| Média (%) | 29,30 | | 33,14 | | 31,06 |
| CV (%) | 14,62 | | | | |

* médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado.

Durante o enraizamento *in vitro* de segmentos apicais caulinares de *Carica papaya* L. ‘Tainung 01’ (mamoeiro), foi observado que, na ausência e com 0,74 μM de AIB no meio nutritivo, não houve formação de raízes nos calos, mas na presença de 1,48; 2,96 e 5,92 μM desta auxina, houve um incremento de microestacas enraizadas a partir de calo, sendo obtidos médias de 10, 15 e 45% respectivamente (SCHMIDT et al., 2010). Contudo, deve-se considerar que o enraizamento efetuado a partir de calo não é desejável na propagação de plantas, uma vez que essas raízes surgem pela rediferenciação das células do calo e, raramente, possuem conexões vasculares com as microestacas regeneradas a partir do calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A ocorrência de calos na base de segmentos apicais caulinares de *Peltophorum dubium* também foi observada por Kirst; Sepel (1996), sendo verificado um comprometimento na formação de raízes.

Para *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (louro-pardo), o melhor enraizamento das brotações foi obtido em meio nutritivo WPM com 0,5 mg L⁻¹ (2,5 μM) de AIB combinado com 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado (MANTOVANI et al., 2001).

Tabela 7 – Formação *in vitro* de raízes (%) em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo MS ou WPM, na presença ou ausência de AIB. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

| %RAIZ | | | | | |
|----------------|------|---|------|---|-----------|
| AIB (μ M) | MS | | WPM | | Média (%) |
| 0 | 0,00 | b | 3,00 | b | 1,27 |
| 10 | 6,00 | b | 0,00 | b | 3,00 |
| Média (%) | 3,00 | | 1,50 | | 2,06 |
| CV (%) | 6,59 | | | | |

* médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

4.3.2 Efeito do tipo e concentração de auxinas na formação *in vitro* de raízes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Para a sobrevivência não houve diferença significativa entre os fatores testados isoladamente, tampouco houve interação. Foi observada uma elevada média geral de 97,98% (CV=2,94%) em todos os tratamentos testados, indicando que esta variável não sofreu efeito das auxinas e concentrações.

Para a formação de calos houve interação ($p=0,000$) dos fatores principais concentração de auxinas e período de avaliação. Para os diferentes períodos de avaliação foram obtidas diferentes respostas de acordo com a concentração de auxinas utilizadas. Na avaliação aos 30 dias observou-se comportamento quadrático em relação às concentrações testadas. Ocorreu um alto índice de formação de calos na ausência de auxinas e, à medida que estas foram acrescentadas ao meio nutritivo, provocaram uma diminuição na formação de calos, que chegaria ao mínimo com a utilização de 14,26 μ M de acordo com o cálculo da MET, aumentando novamente deste ponto em diante (Figura 8). Isso, provavelmente, ocorreu devido a um equilíbrio que se estabeleceu entre os níveis endógenos de auxinas e citocininas, culminando com a formação de calos. No momento em que se acrescentou uma

fonte de auxina exógena ao meio nutritivo, a relação auxina/citocinina foi alterada e a formação calogênica passou a ocorrer em níveis menores. No entanto, as concentrações mais elevadas das auxinas podem ter sido excessivas, provocando, novamente, formação de calos na base dos explantes, que podem comprometer a rizogênese e o crescimento da parte aérea.

Na avaliação aos 60 dias, também se observou comportamento quadrático na formação de calos em relação às concentrações de auxinas. No entanto, na ausência destes reguladores de crescimento a formação de calos foi baixa, passando a ocorrer de forma mais expressiva com a adição de auxinas ao meio nutritivo (Figura 8). O máximo de calogênese seria observado com a concentração 13,8 μM , independentemente da auxina utilizada. O fato de aos 30 dias terem sido observados os maiores índices de formação de calos na ausência de auxinas e aos 60 dias a calogênese não ter ocorrido, deve-se ao fato de que aos 30 dias, quando foi realizada a avaliação, os calos foram removidos da base das brotações para que não prejudicassem a formação de raízes. Nesse caso, os teores de hormônios endógenos reduziram-se e não ocorreu mais a formação de calos.

De maneira semelhante, na ausência de auxinas, a intensidade de formação de calo foi nula em microestacas de *Cydonia oblonga* Mill. cv. MC (marmeleiro), utilizadas como porta-enxerto para *Pyrus spp* (pereira). Porém, com 5, 10 e 15 μM , a maior intensidade de formação de calo foi obtida com AIB e ANA, seguido por AIA. Com AIB e ANA, observou-se um comportamento quadrático para a intensidade de formação de calo em relação à concentração de auxina, obtendo-se o ponto de máxima (notas de 2,06 e 1,33, respectivamente, sendo 1=baixa e 2=alta intensidade de formação de calo) com 20 μM e 17,4 μM destas auxinas respectivamente (ERIG; SCHUCH, 2004).

Durante as avaliações em ápices e brotações de *Swietenia macrophylla* (mogno), não foi verificada a formação de calos na base e nem ao longo das raízes formadas. Provavelmente os níveis endógenos de auxinas nos explantes de mogno eram baixos, por isso não houve a formação de calos (LOPES et al., 2001).

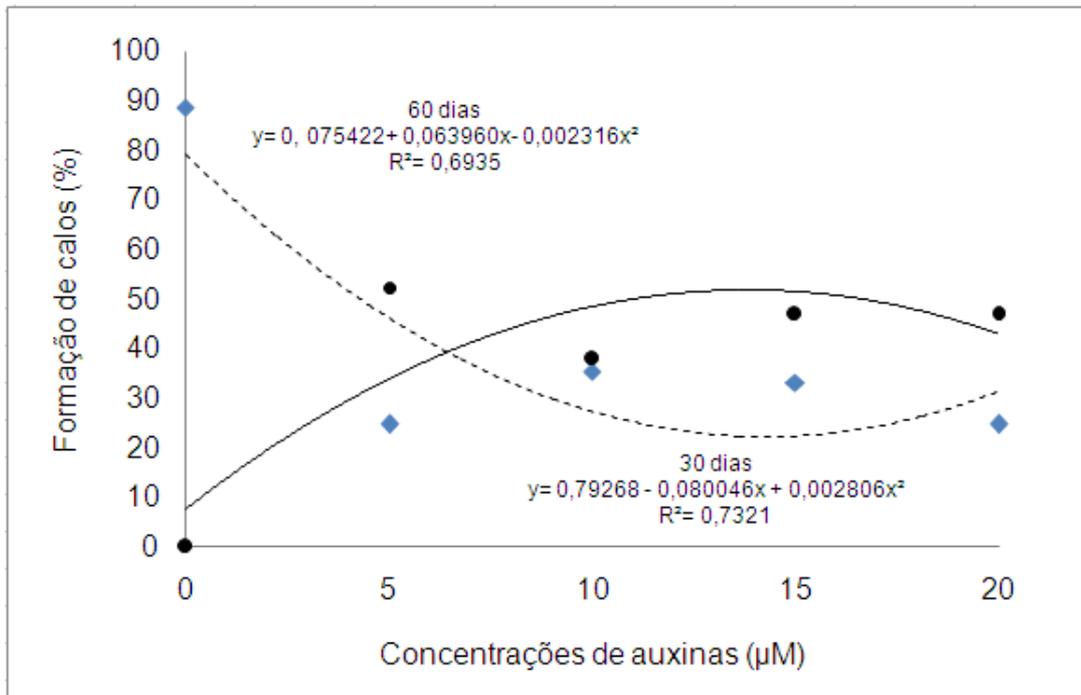


Figura 8 – Formação calogênica (%) na base de brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 e aos 60 dias de cultivo, em meio nutritivo MS (acrescido de diferentes concentrações de ANA, AIB ou 2,4-D). Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

Foi observada interação ($p=0,0397$) para os fatores principais concentração e fonte de auxina quanto à ocorrência de vitrificação nas brotações, indicando que estes dois fatores atuam conjuntamente na ocorrência de vitrificação. De maneira geral, foi observado comportamento quadrático (Figura 9) das brotações que apresentaram aspecto vítreo, o qual não foi observado na ausência de auxinas, independente da auxina utilizada. O máximo de ocorrência de vitrificação, de acordo com o cálculo da MET, seria observado com a utilização de 8,7 μM para AIB, 10,0 μM para ANA e de 13,5 μM para 2,4-D. Geralmente, nas brotações que apresentaram vitrificação, simultaneamente, foi observada a ocorrência de calos na base. Brotações nessa condição são indesejáveis e foram descartadas por ocasião das avaliações, uma vez que têm seu desenvolvimento posterior prejudicado.

Para a formação de raízes não foi observada diferença significativa para os fatores testados, sendo obtida uma média geral de apenas 1,7% de brotações formando raízes. Em geral, após aplicação de auxina sintética, ocorre um aumento imediato no nível endógeno de auxina natural e, conseqüentemente, há o início da

formação de raízes primordiais (SOUZA; PEREIRA, 2007). A ação das auxinas ocorre, inicialmente, em nível celular nos meristemas primário e secundário, estimulando a divisão celular e o subsequente alongamento das células; essa ação inicial das auxinas culmina com a formação das raízes. No entanto, estes autores mostraram que algumas espécies, quando são expostas à ação de auxina exógena, têm o nível de Ácido Indol Acético (AIA) endógeno elevado, mas que decresce antes da formação das raízes, podendo dificultar ou impossibilitar o enraizamento. Em espécies mais difíceis de enraizar, como as espécies lenhosas, AIA endógeno pode ser metabolizado mais rapidamente no centro de produção, quando comparados às espécies de mais fácil enraizamento, resultando em uma baixa concentração de AIA livre para ser transportado para a base das estacas onde ocorrerá o enraizamento. Além disso, as células localizadas na base das estacas de espécies lenhosas que estariam mais aptas a se desdiferenciarem e se transformarem em raízes adventícias, podem estar menos sensíveis às auxinas ou menos competentes para essa rediferenciação, o que poderia explicar a reduzida resposta observada na formação de raízes.

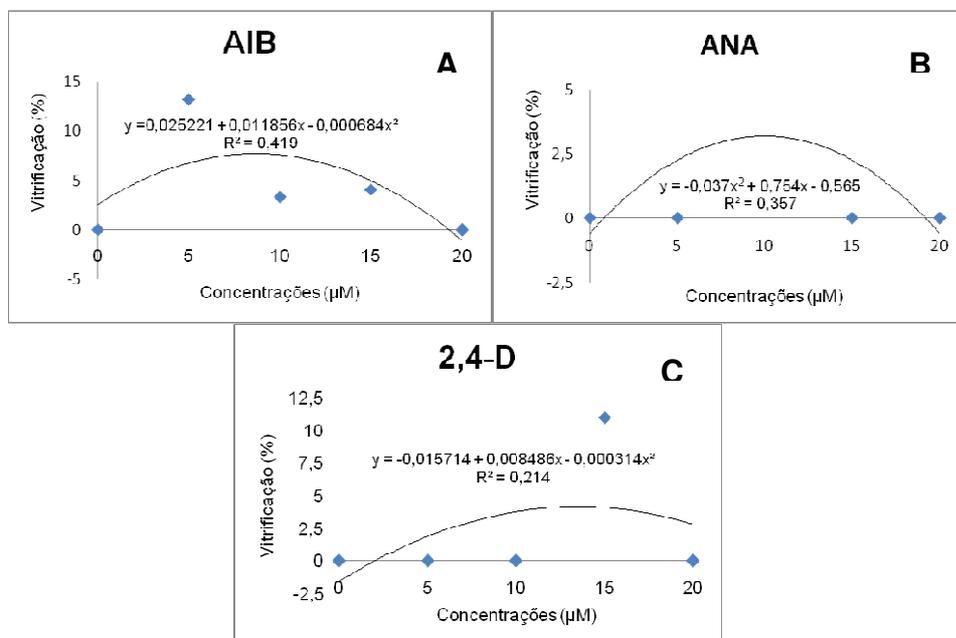


Figura 9 – Vitrificação (%) em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, em porcentagem, aos 60 dias de cultivo, em meio nutritivo MS acrescido de diferentes concentrações de ANA, AIB ou 2,4-D. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

4.3.3 Efeito do meio nutritivo e tratamentos “pulse” de AIB na indução e desenvolvimento *in vitro* de raízes em *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Para a sobrevivência das brotações houve diferença ($p=0,0256$) para o fator principal meio nutritivo, destacando-se, em particular, o meio MS em que se observaram 100% de sobrevivência, seguido pelo meio WPM, que apresentou uma média de 97,9% de sobrevivência, a qual também pode ser considerada satisfatória.

Quanto à formação de calos observou-se efeito significativo dos fatores principais meio nutritivo ($p=0,014$) e período de avaliação ($p=0,000$). No que se refere ao meio nutritivo, os melhores resultados (22,3%) foram obtidos com o meio WPM, seguido pelo meio MS (35,9%). Aos 30 dias, a intensidade de formação de calos foi menor (19,5%) do que aos 60 dias, em que foi observada calogênese em 39,5% das brotações. Provavelmente isso tenha ocorrido devido ao fato de que, aos 30 dias, o período de exposição de seis dias à auxina AIB (tratamento “pulse”) tenha promovido uma maior relação auxina/citocinina e, aos 60 dias, em meio desprovido de AIB, esta relação tenha atingido um certo equilíbrio, promovendo maior formação de calos.

Em segmentos apicais caulinares e brotações de *Swietenia macrophylla* (mogno) com, no mínimo, 2 cm de comprimento, submetidos a tratamentos “pulse” por sete dias com 0,5 a 25 μM de ANA ou de AIB, não foi verificada a formação de calos na base dos explantes e nem ao longo das raízes formadas, o que foi atribuído aos baixos níveis endógenos de auxinas nos explantes (LOPES et al., 2001). No entanto, com o porta-enxerto de *Malus prunifolia* (macieira), Zanol et al. (1997), testando diferentes concentrações de AIB, até um máximo de 0,6 mg L^{-1} (3 μM), e diferentes períodos de exposição dos explantes ao escuro (0 a 9 dias), constataram que os maiores níveis desta auxina e a maior exposição ao escuro promoveram intensa formação de calos na base de brotações, com três pares foliares (2,5 a 3 cm de comprimento), oriundas do processo de multiplicação *in vitro*.

Para brotações que apresentaram vitrificação não houve diferença significativa em relação aos fatores estudados, sendo observada uma média reduzida de 0,4%, o que pode ser considerado satisfatório.

Para a formação de raízes, observou-se interação ($p=0,0585$) dos fatores principais concentração de AIB e meio nutritivo, indicando que o meio nutritivo

utilizado interfere na concentração de AIB utilizada para que ocorra formação de raízes. Observou-se, ainda, efeito significativo do fator principal período de avaliação ($p=0,0026$). Aos 60 dias, obtiveram-se as melhores respostas de formação de raízes (8,1%), superiores às obtidas aos 30 dias (2,3%). Tal fato sugere que é necessário um período maior de cultivo para o desenvolvimento de raízes em *Peltophorum dubium*. No meio MS, observou-se comportamento quadrático da formação de raízes em relação às concentrações de AIB (Figura 10), sendo possível obter formação de raízes mesmo sem a adição de AIB; o máximo de formação de raízes seria obtido com 9,8 μM , de acordo com o cálculo da MET. No caso do meio WPM, também observou-se comportamento quadrático (Figura 10), no entanto, a maior porcentagem de formação de raízes (9,2%) foi verificada na ausência de AIB, decrescendo deste ponto em diante e atingindo o ponto mínimo a 13,7 μM de AIB, segundo o cálculo de MET. As baixas porcentagens de enraizamento obtidas podem ser resultantes da ausência de genótipos responsivos à rizogênese *in vitro*, uma vez que os explantes, de origem seminal, apresentavam variabilidade genética, e sabe-se que diferenças no potencial de enraizamento também podem ser observadas dentro de indivíduos de uma mesma espécie (SOUZA; PEREIRA, 2007). Bassan (2006), avaliando o efeito do carvão ativado e do AIB no enraizamento *in vitro* em *Peltophorum dubium*, atribuiu o número reduzido de explantes enraizados à variabilidade genética existente no material testado, uma vez que os explantes foram, igualmente, provenientes de sementes. O fato de terem sido observadas brotações enraizadas também no tratamento sem a adição de AIB, ainda que em baixa porcentagem, reforça tal hipótese.

Os ganhos em porcentagens de formação de raízes obtidas neste experimento também podem ser atribuídos, em parte, ao uso, no período de desenvolvimento das raízes, de meios nutritivos com a concentração de sais reduzida à metade. De modo geral, o uso de meios menos concentrados tem permitido melhores resultados no enraizamento *in vitro* de brotações. A alta concentração de sais, que compõem o meio básico MS, mesmo em presença de auxinas, pode inibir o enraizamento *in vitro*. Diluições para $\frac{1}{2}$ e até $\frac{1}{4}$ de sais têm possibilitado melhores resultados para muitas espécies de plantas (SOUZA; PEREIRA, 2007).

A indução de raízes em *Ocotea porosa* (imbuia) foi avaliada em meio nutritivo WPM/2 ou MS/2, acrescido de AIB (0; 1,25; 2,5; 5 ou 10 μM) durante sete dias ou com tratamento “pulse” por 10 minutos em soluções de: 0; 2,5; 5 ou 10 mM de AIB, seguido de transferência para meio nutritivo sem regulador vegetal. A indução de raízes em meio WPM/2, suplementado com 2,5 μM de AIB proporcionou 57,5% de enraizamento. Com a adição de 10 μM de AIB em meio MS/2 obteve-se 68,7% de enraizamento. O tratamento “pulse” por 10 minutos em solução de 5 e 10 mM de AIB, induziu 61,1 e 62,5% de enraizamento, respectivamente. O meio MS/2 suplementado com 1 g L⁻¹ de carvão ativado no desenvolvimento de raízes não favoreceu o enraizamento, sendo que a maior porcentagem de enraizamento foi de 40% (PELEGRINI, 2008).

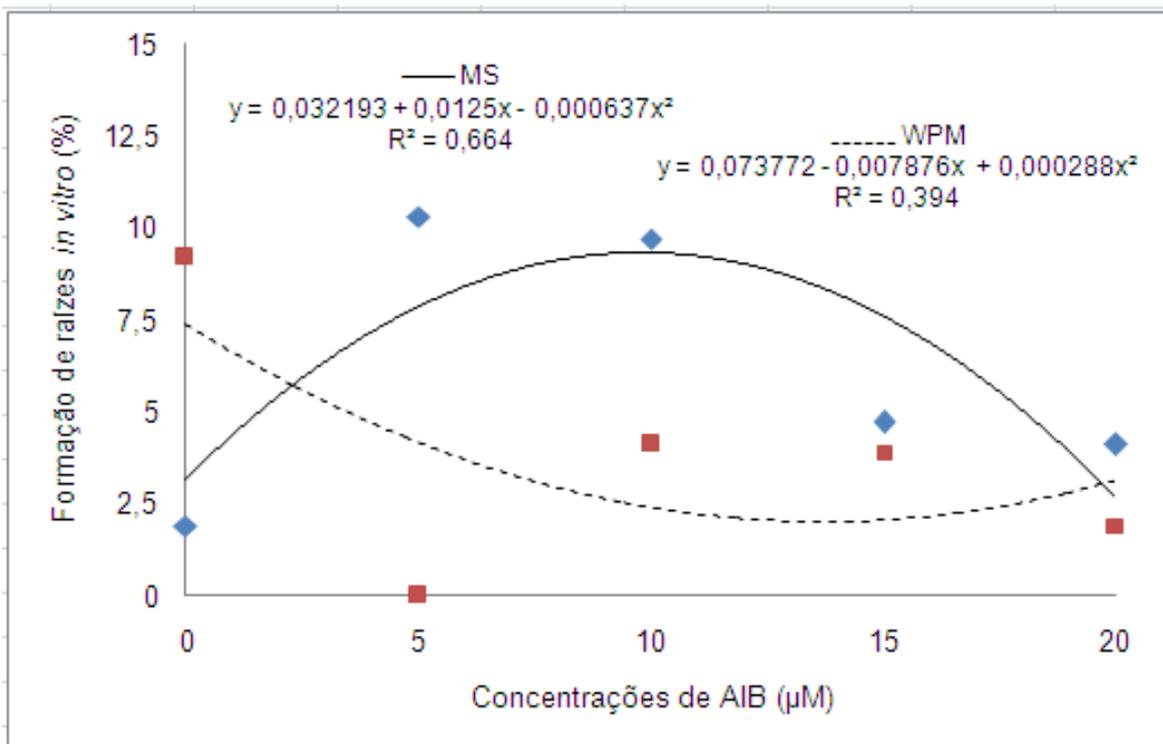


Figura 10 – Formação *in vitro* de raízes (%) em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 60 dias de cultivo, em meio nutritivo MS ou WPM acrescido de diferentes concentrações de AIB durante seis dias (tratamento “pulse”) e posterior cultivo nos respectivos meios com a concentração de sais reduzida à metade, na ausência de AIB. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

A indução de raízes em *Ocotea porosa* (imbuia) foi avaliada em meio nutritivo WPM/2 ou MS/2, acrescido de AIB (0; 1,25; 2,5; 5 ou 10 μM) durante sete dias ou com tratamento “pulse” por 10 minutos em soluções de: 0; 2,5; 5 ou 10 mM de AIB, seguido de transferência para meio nutritivo sem regulador vegetal. A indução de raízes em meio WPM/2, suplementado com 2,5 μM de AIB proporcionou 57,5% de enraizamento. Com a adição de 10 μM de AIB em meio MS/2 obteve-se 68,7% de enraizamento. O tratamento “pulse” por 10 minutos em solução de 5 e 10 mM de AIB, induziu 61,1 e 62,5% de enraizamento, respectivamente. O meio MS/2 suplementado com 1 g L⁻¹ de carvão ativado no desenvolvimento de raízes não favoreceu o enraizamento, sendo que a maior porcentagem de enraizamento foi de 40% (PELEGRINI, 2008).

Com microestacas de *Cydonia oblonga* Mill. cv. MC (marmeleiro), utilizadas como porta-enxerto para *Pyrus* spp (pereira), e utilizando AIB, ANA e AIA, nas concentrações 0; 5; 10; 15 e 20 μM , durante sete dias (tratamento “pulse”), em meio nutritivo constituído pelos sais de MS reduzidos à metade de sua concentração original, verificou-se um comportamento quadrático para o enraizamento em relação à concentração de auxina no meio nutritivo, obtendo a maior média (24,15%) com 10 μM de auxina (o ponto de máxima calculado pela equação foi de 23,75% com 12,6 μM de auxina (ERIG E SCHUCH, 2004). Este resultado reforça a afirmativa de Grattapaglia; Machado (1998), de que quando a concentração de auxina no meio de enraizamento é excessiva, ocorre o comprometimento da rizogênese; o aumento na concentração de auxina exógena provoca efeito estimulador de raízes até um valor máximo, a partir do qual qualquer acréscimo de auxinas tem efeito inibitório.

4.4 Conclusões

- Em meio nutritivo MS, a maior formação de calos é observada na presença de 10 μM de AIB, aos 30 dias. Em meio nutritivo WPM, a maior formação de calos ocorre na ausência de AIB.

- Reduzidas porcentagens de formação de raízes em brotações de *Peltophorum dubium* são obtidas tanto em meio MS como em WPM, independentemente da ausência ou da presença de AIB.
- Em meio nutritivo MS, independentemente da presença ou não de auxinas e, independentemente da concentração utilizada, ocorre calogênese na base das brotações de *Peltophorum dubium* aos 30 dias de cultivo *in vitro*.
- As auxinas ANA, AIB e 2,4-D, em concentrações de até 20 μ M não são eficientes em promover a formação *in vitro* de raízes em brotações de *Peltophorum dubium*.
- O emprego de tratamento “pulse” com AIB por seis dias e a redução na concentração de sais do meio nutritivo após esse período, permite a formação de raízes, independentemente da concentração de AIB e da utilização dos meios MS ou WPM. No entanto, as porcentagens de formação de raízes obtidas ainda não podem ser consideradas satisfatórias.

5 CAPÍTULO III

SUBSTRATOS ALTERNATIVOS NA FORMAÇÃO *in vitro* DE RAÍZES DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

5.1 Objetivo

Este trabalho objetivou avaliar substratos alternativos na formação *in vitro* de raízes de *Peltophorum dubium*.

5.2 Material e Métodos

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da UFSM, em Santa Maria, RS.

As sementes foram coletadas e armazenadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro/Florestas em Santa Maria, RS, e são provenientes da produção de 2005. Na UFSM, permaneceram armazenadas em frascos de vidro contendo sílica gel e acondicionadas sob temperatura de 8-10^o C até o seu emprego em experimentos.

5.2.1 Obtenção das brotações

Inicialmente, as sementes foram submetidas à superação de dormência através de escarificação mecânica com lixa nº 100 na região oposta ao embrião. Em

seguida, em câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas superficialmente em solução de etanol a 70% (v/v) por 30 segundos e, após em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2 % (v/v) por 15 minutos, passando, então, por triplo enxágue em água destilada e autoclavada.

Visando a germinação *in vitro*, as sementes foram inoculadas, sob câmara de fluxo laminar, em frascos de vidro com capacidade para 150 ml, contendo 30 ml de meio ágar-água a 0,7% (p/v), previamente autoclavados por um período de 40 minutos a 120 °C e 1 atm. Em cada frasco foram colocadas três sementes. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3 °C e fotoperíodo de 16 h com intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

No estabelecimento *in vitro* foram utilizados epicótilos com, aproximadamente, 8 a 10 mm de comprimento, isolados das plântulas germinadas *in vitro* após 15 dias de cultivo, obtidas como anteriormente descrito. O meio nutritivo consistiu de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar e 1 g L⁻¹ de carvão ativado. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado por 15 minutos a 120°C e a 1 atm. Sob câmara de fluxo laminar, os epicótilos, em número de três, foram inoculados em frascos de vidro com capacidade para 150 ml contendo 30 ml de meio nutritivo. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Decorridos 30 dias de cultivo, as brotações (epicótilos já estabelecidos) foram utilizados no trabalho de formação *in vitro* de raízes descrito a seguir.

5.2.2 Efeito de substratos alternativos na formação *in vitro* de raízes em *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Brotações estabelecidas em condições assépticas com 30 dias de cultivo (como descrito no item 5.2.1), contendo de 1 a 3 pares de folhas constituíram as unidades amostrais. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente

casualizado, em arranjo fatorial 7x2. Os tratamentos consistiram dos diferentes substratos, em meio base MS (Murashige; Skoog, 1962) com as seguintes combinações, avaliados aos 30 e aos 60 dias:

- 30 ml de meio nutritivo + 7 g L⁻¹ de ágar (M+A);
- 25 ml de meio nutritivo + 30 ml de vermiculita granulometria fina (M+V);
- 25 ml de meio nutritivo + 30 ml de vermiculita granulometria fina + 7 g L⁻¹ de ágar (M+V+A);
- 15 ml de meio nutritivo + 30 ml de Plantmax® (M+P);
- 15 ml de meio nutritivo + 30 ml de Plantmax® + 7 g L⁻¹ de ágar (M+P+A);
- 10 ml de meio nutritivo + 30 ml de areia fina (M+AF) e
- 15 ml de meio nutritivo + 30 ml de areia fina + 7 g L⁻¹ de ágar (M+AF+A).

No total, foram testados 14 tratamentos com 10 repetições cada. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro de 150 ml contendo o volume de meio nutritivo, conforme o tratamento, e três brotações. Foi utilizado o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 10 µM de AIB. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão de ágar (para os tratamentos que o continham), vermiculita, Plantmax® ou areia; e, posteriormente, os substratos foram autoclavados a 120°C e 1 atm de pressão por 15 minutos. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25±3 °C e fotoperíodo de 16 h com intensidade luminosa de 20 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Após a avaliação, aos 30 dias, as brotações foram mantidas por um período adicional de 30 dias em meio nutritivo fresco de constituição idêntica àquele usado no primeiro cultivo. Nas brotações que apresentaram intensa formação de calos na base houve remoção destas estruturas com o intuito de não prejudicar a formação *in vitro* de raízes. As variáveis analisadas foram: sobrevivência das brotações (%SOB), brotações que formaram calo na base (%CALO) e formação *in vitro* de raízes (%RAIZ), todas expressas em porcentagem.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando significativas, utilizou-se, para a comparação das médias, o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de

probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000).

5.3 Resultados e Discussão

Para a sobrevivência houve efeito significativo para os fatores principais período de avaliação ($p=0,0055$) e meio nutritivo ($p=0,000$), não sendo observada interação ($p=0,5672$) dos fatores principais. Quanto ao período de avaliação foi observada maior sobrevivência das brotações (92,3%) aos 30 dias. Aos 60 dias, foi observada uma menor sobrevivência (82,6%), provavelmente decorrente do período de cultivo *in vitro*, uma vez que algumas brotações já apresentavam sinais de senescência. Segundo Bassan (2006), o ciclo *in vitro* de *Peltophorum dubium*, nas condições testadas (semelhantes às deste trabalho) seria de cinco semanas, a partir do qual começariam a ocorrer amarelecimento e abscisão de folhas.

Os tratamentos que apresentaram os piores resultados de sobrevivência foram aqueles que continham o substrato Plantmax® na sua composição, seja combinado com o meio nutritivo ou com o ágar, os quais diferiram entre si e dos demais (Tabela 9). Os demais tratamentos (Figura 11 – A) não diferiram entre si e apresentaram bons resultados, sendo que foi observada de 91,1 a 100,0% de sobrevivência das brotações. Provavelmente, os menores índices de sobrevivência observados nos tratamentos que continham Plantmax® se devem ao volume de meio nutritivo que foi utilizado para umedecer o substrato. Apesar de ter sido menor (15 ml) do que a quantidade utilizada na testemunha (30 ml) e nos tratamentos com vermiculita (25 ml), pôde-se perceber um certo encharcamento do substrato, o que acabou causando necrose na base das brotações (Figura 11 – B) e, por consequência, prejudicou a sua sobrevivência (Figura 11 – C). Talvez o volume de meio nutritivo utilizado também tenha afetado a disponibilidade de nutrientes para as brotações. No entanto, nos substratos que continham areia, o volume de meio nutritivo utilizado foi igual (15 ml, no tratamento que continha ágar), ou menor (10 ml) e, apesar disso, os índices de sobrevivência observados foram satisfatórios, não havendo indícios de deficiência nutricional nas brotações. Hoffmann et al. (2001)

obtiveram a maior sobrevivência com plantas de *Malus domestica* Borkh (macieira) enraizadas em meio geleificado com ágar e em Plantmax®.

Tabela 8 – Sobrevivência (%) de brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 60 dias, cultivadas em diferentes substratos combinados com meio nutritivo MS acrescido de 10 µM de AIB. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

| Substrato | Sobrevivência (%) | |
|------------|-------------------|-----|
| M + A* | 91,1 | a** |
| M + V | 91,1 | a |
| M + V + A | 100 | a |
| M + P | 55,8 | c |
| M + P + A | 79,4 | b |
| M + AF | 91,1 | a |
| M + AF + A | 98,3 | a |
| CV (%) | 8,3 | |

* M+A = 30 ml de meio nutritivo + 7 g L⁻¹ de ágar; M+V= 25 ml de meio nutritivo + 30 ml de vermiculita granulometria fina; M+V+A= 25 ml de meio nutritivo + 30 ml de vermiculita granulometria fina + 7 g L⁻¹ de ágar; M+P= 15 ml de meio nutritivo + 30 ml de Plantmax®; M+P+A= 15 ml de meio nutritivo + 30 ml de Plantmax® + 7 g L⁻¹ de ágar; M+AF= 10 ml de meio nutritivo + 30 ml de areia fina e M+AF+A= 15 ml de meio nutritivo + 30 ml de areia fina + 7 g L⁻¹ de ágar. ** médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado.

Para as brotações que formaram calo na base foi observada interação entre os fatores principais meio nutritivo e período de avaliação (“p” = 0,000), indicando que os dois fatores interferem conjuntamente na calogênese. Aos 30 dias não foi observada formação calogênica no tratamento testemunha (M+A) e nem nos que continham vermiculita como substrato. Nos demais tratamentos, observaram-se reduzidas porcentagens de formação calogênica. Aos 60 dias, nos tratamentos testemunha (M+A) e naqueles que continham vermiculita como substrato (os quais diferiram estatisticamente do restante, mas não diferiram entre si) foi observada intensa formação de calos (Tabela 9, Figura 11 - E) na base das brotações. Nos demais tratamentos, que haviam apresentado formação de calos na base, aos 30

dias, não mais foi observada a presença destas estruturas, uma vez que foram retiradas por ocasião da transferência das brotações para o meio nutritivo fresco e, provavelmente, em decorrência do período de cultivo, estabeleceu-se um equilíbrio na relação auxina/citocinina, culminando com a calogênese.

Explantos de *Vaccinium ashei* Reade cv. 'Delite' e *V. corymbosum* L. cv. 'Georgiagem' (mirtilo) enraizados em meio nutritivo WPM contendo $7 \mu\text{M L}^{-1}$ de AIB, em diferentes substratos, também apresentaram intensa formação de calos na base, principalmente, em vermiculita (DAMIANI; SCHUCH, 2009).

Tabela 9 – Formação de calos (%) na base de brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 e aos 60 dias, cultivadas em diferentes substratos combinados com meio nutritivo MS acrescido de $10 \mu\text{M}$ de AIB. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

| Substrato | 30 dias | | | 60 dias | | | Média (%) |
|------------|---------|---|-----|---------|---|---|-----------|
| M + A* | 0,00 | a | A** | 96,220 | b | B | 45,58 |
| M + V | 0,00 | a | A | 96,220 | b | B | 45,58 |
| M + V + A | 0,00 | a | A | 96,220 | b | B | 45,58 |
| M + P | 3,30 | a | A | 0,000 | a | A | 1,74 |
| M + P + A | 3,30 | a | A | 0,000 | a | A | 1,83 |
| M + AF | 6,60 | a | A | 0,000 | a | A | 3,3 |
| M + AF + A | 3,30 | a | A | 0,000 | a | A | 1,65 |
| Média (%) | 2,36 | | | 40,59 | | | 20,62 |
| CV (%) | 5,45 | | | | | | |

* M+A = 30 ml de meio nutritivo + 7 g L^{-1} de ágar; M+V= 25 ml de meio nutritivo + 30 ml de vermiculita granulometria fina; M+V+A= 25 ml de meio nutritivo + 30 ml de vermiculita granulometria fina + 7 g L^{-1} de ágar; M+P= 15 ml de meio nutritivo + 30 ml de Plantmax®; M+P+A= 15 ml de meio nutritivo + 30 ml de Plantmax® + 7 g L^{-1} de ágar; M+AF= 10 ml de meio nutritivo + 30 ml de areia fina e M+AF+A= 15 ml de meio nutritivo + 30 ml de areia fina + 7 g L^{-1} de ágar. ** médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna e maiúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado.

Para a formação *in vitro* de raízes, foi observada interação entre meio nutritivo e período de avaliação ($p=0,0090$). Aos 30 dias, somente foi observada a formação de raízes, nos tratamentos contendo como substrato, além do meio nutritivo,

vermiculita + ágar, Plantmax® e areia, mas, ainda, em baixas porcentagens. Aos 60 dias, houve formação de raízes em todos os tratamentos testados. O melhor resultado foi obtido no tratamento que continha, como substrato, vermiculita e ágar (tratamento M+V+A), que diferiu dos demais, os quais, por sua vez, não diferiram entre si (Tabela 10). Além de maior formação de raízes, o substrato M+V+A também se destacou pela qualidade do sistema radicular formado, uma vez que foi observada a formação de raízes secundárias (Figura 11 – F), diferentemente do que ocorreu nos demais substratos (Figura 11 – D). Essa superioridade pode ser atribuída ao substrato mais poroso obtido com a utilização de vermiculita que, combinada com o meio nutritivo e o ágar, proporcionou condições mais favoráveis ao desenvolvimento do sistema radicular. Quanto ao período de avaliação, as maiores porcentagens de formação de raízes observadas aos 60 dias sugerem que é necessário um período superior ao de 30 dias para que ocorra a formação *in vitro* de raízes em *Peltophorum dubium*, nas condições testadas.

No porta-enxerto de *Prunus* cv. Mr. S. 1/8 foi possível obter um alto enraizamento no meio MS com vermiculita, o que permitiu a substituição do ágar por vermiculita no meio de enraizamento (VIAGANÓ et al., 2007). A indução do enraizamento e o desenvolvimento das raízes adventícias foram mais eficientes em ágar, seguido da mistura vermiculita + ágar, em composição com meio nutritivo MS acrescido de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB ($4,92 \text{ } \mu\text{M}$), em dois porta-enxertos de *Malus domestica* Borkh (macieira). Além disso, quando o desenvolvimento das raízes ocorreu em vermiculita e em Plantmax®, formaram-se raízes mais curtas e com maior densidade de pelos radiculares, devido à maior aeração nesses substratos, em relação ao meio solidificado com ágar (HOFFMANN et al., 2001). Para um porta-enxerto de *Malus pumilla* (macieira M-9), no meio contendo a vermiculita como substrato, combinada com meio MS/2 e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA ($5,7 \text{ } \mu\text{M}$), a percentagem de miniestacas enraizadas com formação de raízes secundárias foi de 71,6%, valor superior àquele obtido nas miniestacas enraizadas em meio contendo ágar e cinza vegetal. As raízes produzidas em meio contendo vermiculita apresentaram-se mais rústicas, com ramificações e presença de pelos absorventes e, no transplante, para aclimatização, essas características foram determinantes para a obtenção da alta taxa de sobrevivência de plantas (VIEIRA et al., 2007). Leite (1995) testou ágar e vermiculita como substrato para o enraizamento de *Pyrus communis* L. (pereira) e verificou que somente na vermiculita os explantes originavam sistema radicular

ramificado e com presença de pelos absorventes. Para este autor, a vermiculita, além de ser um substrato barato, reduz o custo da matéria-prima em até 8,42 vezes, se comparado ao ágar.

Tabela 10 – Formação *in vitro* de raízes (%) em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 e aos 60 dias, cultivadas em diferentes substratos combinados com meio nutritivo MS acrescido de 10 μ M de AIB. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

| Substrato | 30 dias | | | 60 dias | | | Média (%) |
|------------|---------|---|-----|---------|---|---|-----------|
| M + A* | 0,00 | b | **B | 3,67 | b | B | 1,74 |
| M + V | 0,00 | b | B | 7,33 | b | B | 3,47 |
| M + V + A | 3,30 | b | B | 36,78 | a | A | 19,16 |
| M + P | 3,30 | b | B | 3,67 | b | B | 3,47 |
| M + P + A | 0,00 | b | B | 16,50 | b | A | 7,33 |
| M + AF | 3,30 | b | B | 6,60 | b | B | 4,95 |
| M + AF + A | 0,00 | b | B | 9,90 | b | B | 4,95 |
| Média (%) | 1,41 | | | 11,87 | | | 6,41 |
| CV (%) | 11,11 | | | | | | |

* M+A = 30 ml de meio nutritivo + 7 g L⁻¹ de ágar; M+V= 25 ml de meio nutritivo + 30 ml de vermiculita granulometria fina; M+V+A= 25 ml de meio nutritivo + 30 ml de vermiculita granulometria fina + 7 g L⁻¹ de ágar; M+P= 15 ml de meio nutritivo + 30 ml de Plantmax®; M+P+A= 15 ml de meio nutritivo + 30 ml de Plantmax® + 7 g L⁻¹ de ágar; M+AF= 10 ml de meio nutritivo + 30 ml de areia fina e M+AF+A= 15 ml de meio nutritivo + 30 ml de areia fina + 7 g L⁻¹ de ágar. ** médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado.

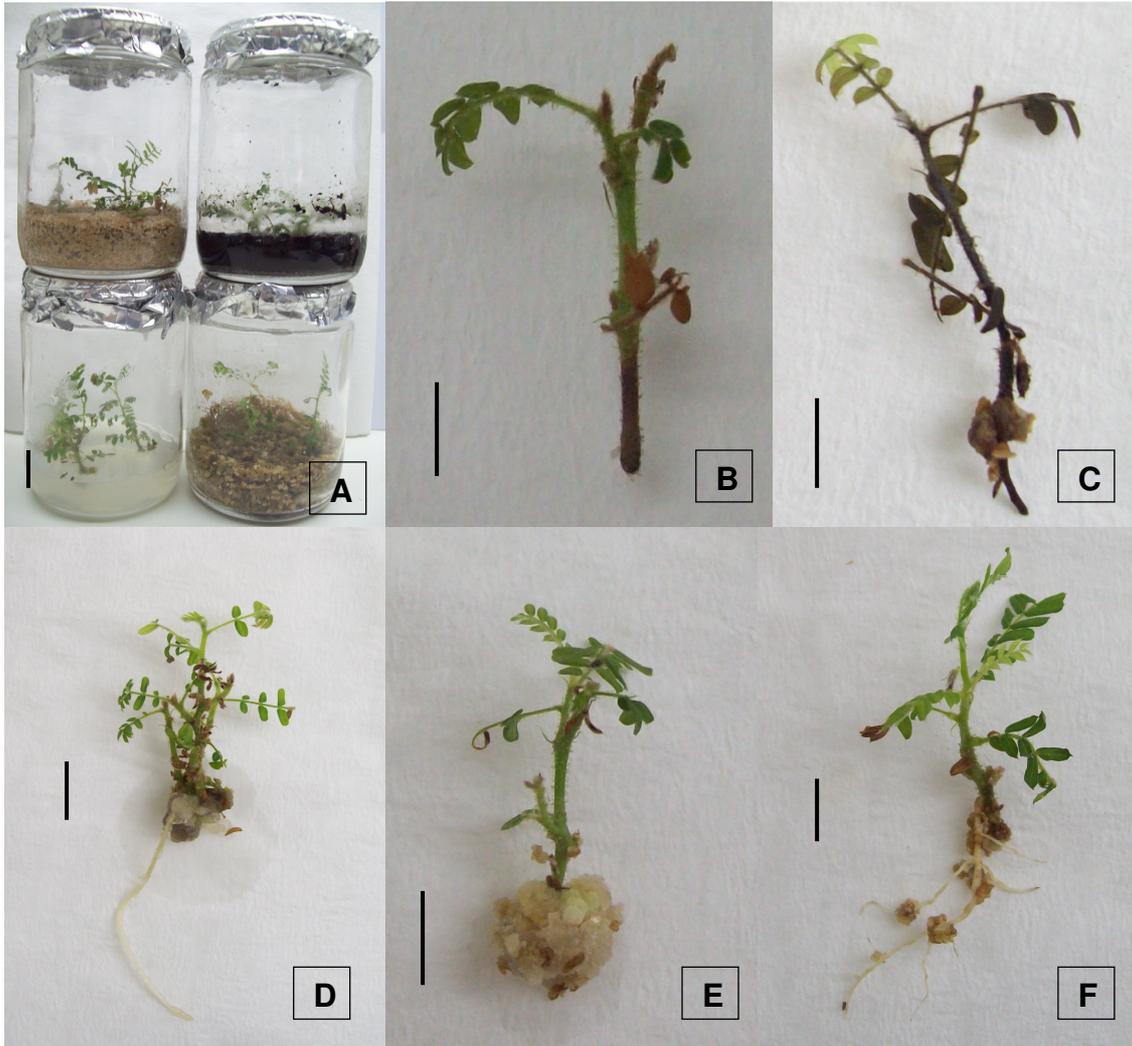


Figura 11 – Aspecto das brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert na formação *in vitro* de raízes em diferentes substratos. Em A) brotações postas para formar raízes em areia, Plantmax®, ágar e vermiculita; em B) observa-se necrose que ocorreu na base das brotações cultivadas em meio contendo Plantmax®, aos 30 dias e em C), aos 60 dias; em D) planta com formação de raiz em meio nutritivo MS contendo 7 g.L⁻¹ de ágar; em E) intensa formação de calos observada na base das brotações em meio contendo vermiculita e em F) planta com formação de raiz em meio contendo vermiculita como substrato. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2010.

5.4 Conclusões

- Ocorre intensa formação de calos na base das brotações, aos 60 dias, quando a vermiculita é utilizada como substrato no processo de formação de raízes.

- Aos 60 dias é possível obter formação de raízes em todos os substratos testados. No entanto, os melhores resultados são obtidos com a utilização da combinação de vermiculita, meio nutritivo e ágar, tanto na porcentagem de formação de raízes, como na qualidade do sistema radicular formado.

CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho trouxe importantes contribuições para a propagação *in vitro* de *Peltophorum dubium*. Os resultados obtidos indicam que, com alguns ajustes, é possível obter resultados mais promissores no cultivo *in vitro* da espécie e que a espécie pode ser micropropagada.

A emissão de brotações adventícias foi obtida com o emprego de epicótilos contendo o nó cotiledonar como explante. A inclusão de carvão ativado no meio nutritivo, na fase de multiplicação, e a exclusão de ANA mostraram-se benéficas para o desenvolvimento das brotações.

A indução de raízes adventícias por meio de tratamento “pulse” pode ser uma alternativa para otimizar a formação de raízes nessa espécie. No entanto, é necessário testar outras concentrações de auxinas ou, até mesmo, maiores tempos de permanência das brotações aéreas em contato com o meio nutritivo acrescido de AIB para aumentar as porcentagens de formação de raízes.

Novos estudos também devem ser realizados utilizando a vermiculita como substrato para a formação *in vitro* de raízes, uma vez que, na sua presença, foi possível obter melhores resultados. Para a otimização do processo, será necessário testar tratamentos que possibilitem a obtenção de resultados satisfatórios apenas com a utilização de substrato à base de vermiculita e meio nutritivo, na ausência de ágar, que é um dos componentes que encarecem o meio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. C. S. de; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden X *E. urophylla* S. T. Blake. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 5, p. 643-653, 2004.

AMARAL, V. F. M. **Multiplicação *in vitro* de *Cedrella fissilis***. 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

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

AUGUSTO, C. S. S.; BIASI, L. A.; TELLES, C. A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.3, p. 473-476, 2006.

BARRUETO CID, L.P. Citocininas. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa/Cenargen, 2000. p. 55 - 81.

BASSAN, J.S. **Comportamento *in vitro* de canafístula [(*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert)]**. 2006. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2006.

BASSAN, J. S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

BASTOS et al. Cultivo *in vitro* de Mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1122-1124, jul. 2007.

BRONDANI, G. E. et al. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v.33, n.1, p.11-19, 2009.

- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa-CNPQ, 1998. v.1. p.87-132.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Colombo, PR: EMBRAPA FLORESTAS, 2003. 1.039p.
- CORREIA, D.; GRAÇA, M. E. C. *In vitro* propagation of black wattle (*Acacia mearnsii* de Wild). **IPEF**, Piracicaba, (48/49), p. 117–125, 1995.
- CUZZUOL, G. R. F. et al. Controle da vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, n. 52, v. 03, p. 604-614, set./dez., 1995.
- DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Diferentes substratos e ambientes no enraizamento *in vitro* de mirtilo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 2, p. 563-566, 2009.
- DUTRA, L. F. et al. Multiplicação *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 220-223, jan./fev., 2004.
- ERIG, A. C. et al. Enraizamento *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, jan./fev. 2004.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Enraizamento *in vitro* de marmeleiro cv. MC como porta-enxerto para a pereira e aclimatização das microestacas enraizadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1443-1449, set/out, 2004.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- GIRI, C. C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, n. 18, p. 115-135. 2004.
- GOLLE, D. P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese *in vitro* e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucreta* DC.** 2010. 161 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

GRAÇA, M.E.C.; FILHO, A.N.K.; MEDEIROS, A.C.S; TAVARES, F.R. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron, na multiplicação “*in vitro*” de brotações de *Eucalyptus dunnii* maid. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.43, p.107-112, jul./dez. 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1998. v 1. p. 183-260.

HOFFMANN, A. et al. Substratos na indução e desenvolvimento *in vitro* de raízes em dois porta-enxertos de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 11, p. 1371-1379, nov. 2001.

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

KIELSE, P. et al. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rígida*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.4, p.1098-1104, jul, 2009.

KIRST, M.; SEPEL, L. M. N. Micropropagação de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert a partir de ápices caulinares de plântulas. In: SIMPÓSIO SOBRE ECOSISTEMAS NATURAIS DO MERCOSUL, 1., 1996, Santa Maria. Anais... Santa Maria: UFSM, 1996. p.141-146.

LEITE, G. B. **Efeito de reguladores de crescimento, substrato, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OHxF97**. 1995. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fruticultura) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1995.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de amoreira-preta 'Xavante': efeito da concentração de sais, do tipo de explante e de carvão ativado no meio de cultura. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, n.spe, p. 1959-1966, 2009.

LOPES, S. C. et al. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **CERNE**, Lavras v.7, n.1, p.124-128, 2001.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368 p.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montaim laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combinet Proceedings International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-427, 1981.

LU, C. Y.; The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cellular and Development Biology- Plant**, v.29, p.92-96, 1993.

MACHADO, M. P. et al. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de videira VR043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 648-655, jul./ago., 2006.

MACKAY W. A, TIPTON J. L, THOMPSON G. A. Micropropagation of Mexican redbud (*Cercis canadensis* var. *Mexicana*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 43, p. 295–299, 1995.

MANTOVANI, N.C. et al. Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.9, n.1, p.47-61, 1999.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, n. 1, p. 437-496, 1962.

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Development Biology- Plant**, v.34, p.267-275, 1998.

NICOLOSO, F. T. et al. Micropropagação do Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 3, n. 2, p. 11-18, 2001.

NUNES, E. C. et al. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague. n. 70, p. 259–268, 2002.

PASQUAL, M.; PEIXOTO, P. H. P.; SANTOS, J. C. dos; PINTO, J. E. B. P. Propagação *in vitro* da amora-preta (*Rubus* sp.) cv Ébano: uso de reguladores de crescimento. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 15, n. 3, p. 282-286, 1991.

PELEGRINI, L.L. **Micropropagação de *Ocotea porosa* (Ness ex Martius) Liberato Barroso (Imbuia)**. 2008, 106f. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2008.

QUOIRIN, M. et al. Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, n. 66, p.199–205, 2001.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, Amsterdã, v.78, p.437-442, 1977.

RADMANN, E. B. et al. Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto 'Tsukuba 1' (*Prunus persica* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.3, p. 656-663, 2009.

ROCHA, S. C. **Micropropagação da canjarana (*Cabralea canjerana*)**. 85 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ROCHA, S. C. et al. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.31, n.1, p.43-50, 2007.

ROCHA, P. S. G. et al. Multiplicação e alongamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 1, p. 69-74, Jan./Feb., 2009.

SANTANA, J. R. F.; BRITO, A. L.; PAIVA, R. Influência do AIB e do carvão ativado no enraizamento, crescimento e desenvolvimento de microplantas de *Annona glabra* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 45.; CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 15.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2., 2005, Fortaleza, CD. **Anais...** Fortaleza, 2005. CD-ROM.

SCHMIDT, E.R. et al. Níveis de ácido indol butírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro 'Tainung 01'. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v.32, n.1, p. 125-129, 2010.

SCHOTTZ, E. S. et al. *In vitro* multiplication of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) from juvenile shoots. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 2, p. 109-117, abr-jun, 2007.

SHAMSUDEEN VARISAI, M. et al. Effect of cytokinins on the proliferation of multiple shoots in Horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam) Verdc). **Journal of Plant Biotechnology**, v.1, p.79-83, 1999.

SILVA, R. P.; MENDES, B. M. J.; MOURAO FILHO, F. A. A. Indução e cultivo *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja-azedo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.43, n.10, p. 1331-1337, 2008.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. **Exp. Biol.**, v. 11, p. 118-130, 1957.

SOARES, F. P. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, jul./ago., 2007.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.4, p.103-117, 2007.

TELES, C. A.; BIASI, L. A. Organogênese do caquizeiro a partir de ápices meristemáticos, segmentos radiculares e foliares. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 27, n. 4, p. 581-586, Oct./Dec., 2005.

TERMIGNIONI, R.R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 182p.

VIAGANÓ, R. C. et al. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* cv. Mr. S. 1/8: concentrações de IBA em meio de cultura acrescido de ágar ou vermiculita. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 60-65, Jul/Set, 2007.

VICENTINI, L. S. **Propagação vegetativa “in vitro” de imbuia (*Ocotea porosa* Nees) e sassafrás (*Ocotea odorifera* Vellozo)**. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

VIEIRA, R. L.; LEITE, G. B.; WAMSER, A. F. Efeito de substratos porosos no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira M-9 (*Malus pumilla*). **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 29, n.1, p. 128-132. 2007.

VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cultivar Brazos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 266-270, mar./abr., 2006.

VILLA, F. et al. Influência do carvão ativado e BAP na multiplicação *in vitro* de duas frutíferas de clima temperado. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 312, p. 118-124, 2007.

VILLA, F. et al. Meios de cultura e reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.11, n.2, p.109-117, Mar./Apr. 2010.

WU, J. H. et al. Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*. **Plant Cell , Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, n. 1, p. 17-25, 2009.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. Viçosa: Ed. UFV, 2009. 272 p.

ZANOL, G.C. et al. Escuro e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* e atividade da peroxidase de porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido (*Malus prunifolia*) **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.3, n. 31, p. 23-30, jan-abr, 1997.

ANEXOS

Anexo A - Composição dos meios nutritivos MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981).

| | MS (mg L ⁻¹) | WPM (mg L ⁻¹) |
|--|--------------------------|---------------------------|
| Macronutrientes | | |
| Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O | - | 556,000 |
| NH ₄ NO ₃ | 1650,000 | 400,000 |
| KNO ₃ | 1900,000 | - |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 440,000 | 96,000 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 370,000 | 370,000 |
| KH ₂ PO ₄ | 170,000 | 170,000 |
| K ₂ SO ₄ | - | 990,000 |
| Micronutrientes | | |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 22,300 | 22,300 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8,600 | 8,600 |
| H ₃ BO ₃ | 6,200 | 6,200 |
| KI | 0,830 | - |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,250 | 0,250 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,025 | 0,250 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,025 | - |
| Ferro-EDTA | | |
| Na ₂ EDTA | 37,250 | 37,250 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 27,850 | 27,850 |
| Vitaminas | | |
| Tiamina-HCl | 0,100 | 1,000 |
| Piridoxina-HCl | 0,500 | 0,500 |
| Ácido Nicotínico | 0,500 | 0,500 |
| Glicina | 2,000 | 2,000 |
| Mio-Inositol | 100,000 | 100,000 |

*Dados adaptados de Xavier et al. (2009).