

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

**GERMINAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE
GRÁPIA (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Kelen Haygert Lencina

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

**GERMINAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE GRÁPIA
(*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.)**

Kelen Haygert Lencina

Dissertação de mestrado apresentada ao 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**

Orientador: Prof. Dilson Antônio Bisognin, PhD.

Santa Maria, RS, Brasil.

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lencina, Kelen Haygert
Germinação e multiplicação in vitro de grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.) / Kelen Haygert
Lencina.-2013.
91 p. ; 30cm

Orientador: Dilson Antônio Bisognin
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2013

1. Plântulas 2. Micropropagação 3. Multiplicação 4. Segmentos nodais 5. Citocinina. I. Bisognin, Dilson Antônio II. Título.

**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**

**GERMINAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE GRÁPIA (*Apuleia
leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.)**

elaborada por
Kelen Haygert Lencina

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dilson Antônio Bisognin, PhD.
(Presidente/Orientador)

Cleber WittSaldanha, Dr.
(FEPAGRO)

Rejane Flores, Dr^a.
(IFF/SVS)

Santa Maria, 01 de março de 2013.

A Rozangela e Guilherme Martin

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, por meio do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, pela contribuição a minha formação acadêmica, e à CAPES, pelo fornecimento do apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Professor Dilson Antônio Bisognin, PhD. Pela liberdade e confiança com meu trabalho, pela orientação, pela dedicação com as pesquisas desenvolvidas no Núcleo de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas (MPVP), e, sobretudo, pela contribuição na minha vida pessoal e acadêmica.

Ao Professor Dr. Frederico Dimas Fleig – atualmente coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal e co-orientador deste trabalho – pelo exemplo de dedicação, paciência e compreensão em momentos difíceis.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Tita e Rone, pelo auxílio e paciência.

À Professora Dra. Rejane Flores e Dr. Cleber Saldanha Witt, pela disponibilidade para contribuir com este trabalho.

Paula Kielse, pela dedicação e amizade. Mesmo este trabalho sendo um caminho solitário você foi minha companhia. Obrigada!

À meus amigos e colegas que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade, apoio e ajuda para a realização deste trabalho gostaria de expressar minha profunda gratidão: Michele Heberle, Nathalia Pimentel, Francisco Saccol, Eliseo Salvatierra, Carlise Pereira, Hardi Fisher e Vivian Alkain.

Às amigas que fazem parte da minha vida há tanto tempo, Renata Schlesner, Verônica e Rosana Tironi, por todos os anos de amizade e por todos os momentos compartilhados.

Agradecimentos a Elis Deon, Janaina Rocha, Gisele Gomez, Catarine Consensa, Jéssica Goulart e Jardel Boscardin pela valorosa amizade. Sinto que nós percorremos este caminho juntos, nos complementando e nos fortalecendo. Obrigada pela rica troca e cumplicidade.

Agradeço ao meu pai, Décio (*in memoriam*), à minha avó Diamantina, à minha tia Janea pelo apoio durante essa trajetória.

Obrigada Neuza e Rita por cuidarem do meu tesouro com tanto amor, para que pudesse desenvolver esse trabalho.

Por fim agradeço à minha mãe Rozangela, às minhas irmãs Miqueli e Thais, ao Alex e Eduarda, ao meu irmão emprestado Rafael, e ao Tarcisio e Guilherme Martin. Deixei vocês por último, porque sempre deixo o melhor para o final, e vocês são o melhor da minha vida.

Obrigada mãe, pelo seu apoio incondicional ao longo de toda minha vida, sempre apoiando minhas opções, e acima de tudo por sonhar os meus sonhos.

À Miqueli, por me mostrar sempre o melhor caminho, e mesmo que saiba qual seja ele, me incentiva na luta contra os obstáculos que a vida põe em nosso caminho. Rafael, pelo apoio e amizade.

Tarcisio, obrigada pelo companheirismo e por sempre acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava.

Ao Guilherme Martin, por encher a minha vida de alegria e amor.

Vocês são minhas fortalezas, meus pilares, minha fonte de carinho.

RESUMO

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

GERMINAÇÃO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE GRÁPIA (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.)

AUTORA: KELEN HAYGERT LENCINA

ORIENTADOR: DILSON ANTÔNIO BISOGNIN

Local e data: Santa Maria, 01 de março de 2013.

O objetivo deste estudo foi avaliar a germinação e multiplicação *in vitro* de grápia, visando a produção de mudas e a conservação de genótipos selecionados. Para a desinfestação, as sementes passaram primeiramente pelo tratamento de quebra de dormência tegumentar com ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado por 20 min. Posteriormente foram avaliadas as concentrações de 0; 2,5 e 5,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl) nos tempos de imersão de 5, 10 e 15 min. na desinfestação das sementes. As sementes foram inoculadas em frascos de vidro contendo 5 mL de meio de cultura composto por água destilada, sacarose (30 g L^{-1}) e ágar (7 g L^{-1}). Aos 30 dias foram avaliadas as porcentagens de germinação e desinfestação, o tempo médio de germinação (TMG) e o índice de velocidade de germinação (IVG). Sementes desinfestadas também foram inoculadas em meio de cultura WPM (Wood Plant Medium) suplementado com 4, 5 e 6 g L^{-1} de ágar, combinado com 10, 20 ou 30 g L^{-1} de sacarose e cultivadas no escuro durante os sete primeiros dias ou na luz durante todo o período. Aos 15 dias foram avaliadas a porcentagem de germinação, a altura da parte aérea (cm), o número de folhas e entrenós, o comprimento total das raízes (cm), o TMG e o IVG. As plântulas assépticas foram transplantadas para meio de cultura WPM, MS ou $\frac{1}{2}$ MS. Aos 15 dias foram avaliadas quanto à altura da parte aérea (cm), o comprimento total das raízes (cm) e o número de segmentos nodais e de folhas. O tratamento de superação de dormência das sementes de grápia com (H_2SO_4) associado à pré-desinfestação com etanol 70% promoveram eficiente desinfestação das sementes, sem a necessidade do uso de NaOCl. Sementes mantidas no escuro apresentaram menor TMG, maior IVG e altura da parte aérea. O meio de cultura WPM suplementado com 4 g L^{-1} de ágar e 10 g L^{-1} de sacarose é indicado para a conservação *in vitro* das plântulas de grápia. Para a multiplicação, segmentos de diferentes posições da parte aérea da plântula (basal, mediana e apical) foram inoculados em meio de cultura WPM acrescido de 0; 2,2; 4,4; 6,6 ou $8,8\text{ }\mu\text{M}$ de 6-benzilaminopurina (BAP). Segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura WPM suplementado com 0; 2,2; 4,4; 6,6 ou $8,8\text{ }\mu\text{M}$ de BAP e com 0 e $1,5\text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado. Segmentos nodais também foram inoculados em meio de cultura WPM acrescido de 0; 2,3; 4,6; 6,9 e $9,2\text{ }\mu\text{M}$ de cinetina (KIN) e de 0 e $1,5\text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado. Os três experimentos foram avaliados aos 30 dias quanto à presença de calo, o número e comprimento total dos brotos (cm), o número de folhas, a porcentagem de enraizamento e o número e comprimento total das raízes (cm). Microcepas foram mantidas em meio de cultura WPM com 0; 2,2; 4,4; 6,6 e $8,8\text{ }\mu\text{M}$ de BAP e 0 e $1,5\text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado. Após 30 dias de cultivo as microcepas foram subcultivadas em meio de cultura WPM suplementado com $1,5\text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado. Aos 30 dias de cultivo ou de subcultivo as microcepas foram avaliadas quanto à sobrevivência, a porcentagem de brotação, o número e comprimento total dos brotos (cm) e o número de segmentos nodais e de folhas. Segmentos basais apresentaram o maior número e comprimento dos brotos. A adição de $6,6\text{ }\mu\text{M}$ de BAP proporcionou o maior número de brotos. O carvão ativado reduziu a formação de calo e favoreceu o enraizamento. A KIN não favoreceu a formação de brotos. A adição de $8,8\text{ }\mu\text{M}$ de BAP ao meio WPM resulta no maior número de brotos em microcepas subcultivadas em meio WPM com $1,5\text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado.

Palavras-chave: Plântulas. Micropropagação. Multiplicação. Segmentos nodais. Citocinina.

ABSTRACT

Master Thesis
Graduate Program of Forest Engineering
Universidade Federal de Santa Maria

***IN VITRO* GERMINATION AND MULTIPLICATION OF GRAPIA (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.)**

AUTHOR: KELEN HAYGERT LENCINA

ADVISOR: DILSON ANTÔNIO BISOGNIN

Place and date of defense: Santa Maria, March 1st, 2013.

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* germination and multiplication of grapia for plantlet production and conservation of selected genotypes. For *in vitro* establishment, three concentrations (0; 2.5 and 5.0%) of sodium hypochlorite (NaOCl) and seed immersion times of 5, 10 and 15 min were tested. Seeds were then inoculated in glass flasks with 5 mL of distilled water, sucrose (30 g L⁻¹) and agar (7g L⁻¹) medium. The evaluations were done at 30 days of cultivation for the percentage of germination and desinfection, mean germination time (TMG) and germination speed index (IVG). Disinfected seeds were also inoculated in WPM (Wood Plant Medium) medium supplemented with 4, 5 or 6 g L⁻¹ of agar combined with 10, 20 or 30 g L⁻¹ of sucrose, and maintained under dark condition of the first seven days or light during the whole period of cultivation. The evaluations were done at 15 days for the percentage of germination, height of aerial part, number of leaves and internodes, total root length, TMG and IVG. Aseptic seedlings were transplanted to WPM, MS or ½ MS culture medium. After 15 days, they were evaluated for height of aerial part, total root length and number of internodes and leaves. The treatment of breaking seed dormancy associated with ethanol 70% promotes efficient desinfection of grapia seeds, even without NaOCl immersion. Seeds maintained in dark showed the lowest TMG, the greatest IVG and the highest aerial part. The WPM medium supplemented with 4 g L⁻¹ of agar and 10 g L⁻¹ of sucrose is indicated for maintenance of grapia seedlings. For multiplication, segments of different positions (basal, medium and apical) were inoculated in WPM medium supplemented with 0; 2.2; 4.4; 6.6 or 8.8 µM of 6-benzylaminopurine (BAP). Nodal segments were inoculated in WPM medium supplemented with 0; 2.2; 4.4; 6.6 or 8.8 µM of BAP and 0 and 1.5 g L⁻¹ of activated charcoal. Nodal segments were also inoculated in WPM medium supplemented with 0; 2.3; 4.6; 6.9 and 9.2 µM of kinetin (KIN) and 0 and 1.5 g L⁻¹ of activated charcoal. The three experiments were evaluated at 30 days for the presence of callus, number and total length of sprouts, number of leaves, rooting percentage, and number and total length of roots. Microstumps were maintained in WPM medium with 0; 2.2; 4.4; 6.6 and 8.8 µM of BAP and 0 and 1.5 g L⁻¹ of activated charcoal. After 30 days, microstumps were subcultured in WPM medium with 1.5 g L⁻¹ of activated charcoal. After 30 days of cultivation in BAP and subcultured in activated charcoal, microstumps were evaluated for survival, percentage of sprouting, number and total length of sprouts and number of internodes and leaves. Basal segments showed the greatest number and length of sprouts. The WPM medium supplemented with 6.6 µM of BAP resulted in the greatest number of sprouts. The activated charcoal reduced callus formation and favored root formation. KIN did not favor sprout formation. The WPM medium supplemented with 8.8 µM of BAP increases the number of sprouts and leaves in microstumps subcultured in WPM medium with 1.5 g L⁻¹ of activated charcoal.

Key-words: Seedlings. Micropropagation. Nodal segments. Microstumps. Cytosine.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Comprimento de brotos (cm) de segmentos de grápia (*Apuleia leiocarpa*) inoculados em meio nutritivo WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), independente da posição de coleta do explante. UFSM, Santa Maria, RS, 2012..... 57
- FIGURA 2 – Segmentos nodais de grápia (*Apuleia leiocarpa*) inoculados em meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado (A) e sem carvão ativado (B). UFSM, Santa Maria, RS, 2012..... 61
- FIGURA 3 – Segmentos nodais de grápia (*Apuleia leiocarpa*) enraizados em meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) com 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado (A) e sem carvão ativado (B), independente das concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). UFSM, Santa Maria, RS, 2012..... 63
- FIGURA 4 – Porcentagem de calo em segmentos nodais de grápia (*Apuleia leiocarpa*) mantidos em meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) em função das concentrações de cinetina (KIN), independente da presença ou não de carvão ativado. UFSM, Santa Maria, RS, 2012..... 65
- FIGURA 5 – Microcepas de origem seminal de grápia (*Apuleia leiocarpa*) mantidas em meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) com 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado (A) e sem carvão ativado (B), independentes das concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). UFSM, Santa Maria, RS, 2012..... 67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Número de sementes germinadas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>), tratadas com 0, 2,5 ou 5,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), por 5, 10 ou 15 min., avaliada a cada 3 dias em sala de crescimento. UFSM, Santa Maria, RS, 2012.....	36
TABELA 2 –	Porcentagem de germinação e desinfestação de sementes de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) tratadas com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0, 2,5 ou 5,0%, por 5, 10 ou 15 min., aos 30 dias em sala de crescimento. UFSM, Santa Maria, RS, 2012.....	38
TABELA 3 –	Tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVG), expresso em dias, de sementes de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) tratadas com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0, 2,5 ou 5,0%, por 5, 10 ou 15 min., aos 30 dias em sala de crescimento. UFSM, Santa Maria, RS, 2012.....	39
TABELA 4 –	Altura da parte aérea, comprimento de raízes, número de segmentos nodais e folhas de plântulas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) estabelecidas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), ½ MS e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), avaliadas aos 15 dias. UFSM, Santa Maria, RS, 2012.....	41
TABELA 5 –	Altura da parte aérea, número de segmentos nodais, número de folhas e comprimento total das raízes de plântulas grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) obtidas de sementes mantidas no escuro e na luz, durante os sete primeiros dias de inoculação, independente das concentrações de sacarose e ágar. UFSM, Santa Maria, RS, 2012.....	43
TABELA 6 –	Porcentagem de germinação, tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVG) de plântulas grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) obtidas de sementes mantidas no escuro e na luz, durante os sete primeiros dias de inoculação, independente das concentrações de sacarose e ágar. UFSM, Santa Maria, RS, 2012.....	44
TABELA 7 –	Número e comprimento de brotos de segmentos de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) excisados de diferentes porções da plântula, mantidos em meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), independente das concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). UFSM, Santa Maria, RS, 2012.....	56
TABELA 8 –	Número de brotos e porcentagem de calo em segmentos nodais de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) inoculados em meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) na presença e ausência de carvão ativado e diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). UFSM, Santa Maria, RS, 2012.....	60

TABELA 9 –	Número de folhas e porcentagem de enraizamento em segmentos nodais de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) inoculados em meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) com e sem carvão ativado, e diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). UFSM, Santa Maria, RS, 2012.....	62
TABELA 10 –	Comprimento dos brotos (CB), número de folhas (NF) e porcentagem de calo (%C) de segmentos nodais de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) mantidos em meio de cultura WPM (LLOYD e MC COWN, 1980) com e sem carvão ativado, independente das concentrações de cinetina (KIN). UFSM, Santa Maria, RS, 2012.....	65
TABELA 11 –	Número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento de brotos (CB), número de segmentos nodais por broto (NSN) e porcentagem de brotação (%B), aos 30 dias, em microcepas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) mantidas em meio de cultura WPM com e sem carvão ativado, independente das doses de BAP (μM). UFSM, Santa Maria, RS, 2012.....	66
TABELA 12 –	Número de brotos em microcepas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) mantidas em meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) na presença ou ausência de carvão ativado aos 30 dias de subcultivo. UFSM, Santa Maria, RS, 2012.....	69

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A1 –	Resumo da análise de variância para a porcentagem de desinfestação de sementes de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função das concentrações de hipoclorito (0, 2,5 e 5% de cloro ativo) e dos tempos de imersão (5, 10 e 15 min.), avaliadas aos 30 dias.....	84
APÊNDICE A2 –	Resumo da análise de variância para a porcentagem de germinação de sementes de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função das concentrações de hipoclorito (0, 2,5 e 5% de cloro ativo) e dos tempos de imersão (5, 10 e 15 min.), avaliadas aos 30 dias.....	84
APÊNDICE A3 –	Resumo da análise de variância para a altura de plântulas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função dos tipos de meio de cultura (WPM, MS e ½ MS), avaliadas aos 30 dias.....	84
APÊNDICE A4 –	Resumo da análise de variância para o número de folhas de plântulas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função dos tipos de meio de cultura (WPM, MS e ½ MS), avaliadas aos 30 dias.....	84
APÊNDICE A5 –	Resumo da análise de variância para o número de segmentos nodais de plântulas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função dos tipos de meio de cultura (WPM, MS e ½ MS), avaliadas aos 30 dias.....	85
APÊNDICE A6–	Resumo da análise de variância para o comprimento de raiz de plântulas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função dos tipos de meio de cultura (WPM, MS e ½ MS), avaliadas aos 30 dias.....	85
APÊNDICE A7 –	Resumo da análise de variância para a altura da plântula de plântulas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função da condição de luminosidade (luz e escuro), concentração de sacarose (10, 20 e 30 g L ⁻¹) e de ágar (4, 5 e 6 g L ⁻¹), avaliadas aos 30 dias.....	85
APÊNDICE A8 –	Resumo da análise de variância para número de segmentos nodais de plântulas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função da condição de luminosidade (luz e escuro), concentração de sacarose (10, 20 e 30 g L ⁻¹) e de ágar (4, 5 e 6 g L ⁻¹), avaliadas aos 30 dias.....	86

APÊNDICE A9 –	Resumo da análise de variância para o número de brotos em explantes de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 μM) e da posição do segmento (basal, mediana e apical), avaliada aos 30 dias.....	86
APÊNDICE A10 –	Resumo da análise de variância para o comprimento de brotos em explantes de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 μM) e da posição do segmento (basal, mediana e apical), avaliada aos 30 dias.....	86
APÊNDICE A11–	Resumo da análise de variância para o número de brotos em segmentos nodais de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 μM), avaliada aos 30 dias.....	87
APÊNDICE A12 –	Resumo da análise de variância para porcentagem de calo em segmentos nodais de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 μM), avaliada aos 30 dias.....	87
APÊNDICE A13 –	Resumo da análise de variância para o número de folhas em segmentos nodais de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 μM), avaliada aos 30 dias.....	87
APÊNDICE A14 –	Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento em segmentos nodais de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 μM), avaliada aos 30 dias.....	87
APÊNDICE A15 –	Resumo da análise de variância para o comprimento de brotos em segmentos nodais de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de cinetina (0; 2,3; 4,6; 6,9; 9,2 μM), avaliada aos 30 dias.....	88
APÊNDICE A16 –	Resumo da análise de variância para o número de folhas em brotos de segmentos nodais de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de cinetina (0; 2,3; 4,6; 6,9; 9,2 μM), avaliada aos 30 dias.....	88

APÊNDICE A17 –	Resumo da análise de variância para porcentagem de calo em segmentos nodais de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de cinetina (0; 2,3; 4,6; 6,9; 9,2 µM), avaliada aos 30 dias.....	88
APÊNDICE A18 –	Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento em segmentos nodais de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de cinetina (0; 2,3; 4,6; 6,9; 9,2 µM), avaliada aos 30 dias.....	88
APÊNDICE A19 –	Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de microcepas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.....	89
APÊNDICE A20 –	Resumo da análise de variância para porcentagem de brotação em microcepas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.....	89
APÊNDICE A21 –	Resumo da análise de variância para o número de brotos em microcepas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.....	89
APÊNDICE A22 –	Resumo da análise de variância para o comprimento dos brotos em microcepas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.....	89
APÊNDICE A23 –	Resumo da análise de variância para o número de segmentos nodais em brotos de microcepas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.....	90
APÊNDICE A24 –	Resumo da análise de variância para o número de folhas em brotos de microcepas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.....	90

APÊNDICE A25 –	Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de microcepas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) durante subcultivo em meio livre, em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.....	90
APÊNDICE A26 –	Resumo da análise de variância para porcentagem de brotação de microcepas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) durante subcultivo em meio livre, em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.....	90
APÊNDICE A27 –	Resumo da análise de variância para número de brotos em microcepas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) durante subcultivo em meio livre, em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.....	91
APÊNDICE A28 –	Resumo da análise de variância para comprimento dos brotos em microcepas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) durante subcultivo em meio livre, em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.....	91
APÊNDICE A29 –	Resumo da análise de variância para número de segmentos nodais em brotos de microcepas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) durante subcultivo em meio livre, em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.....	91
APÊNDICE A30 –	Resumo da análise de variância para número de folhas em brotos de microcepas de grápia (<i>Apuleia leiocarpa</i>) durante subcultivo em meio livre, em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L ⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.....	91

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Descrição da espécie.....	20
2.2 Micropropagação	21
2.2.1 Germinação e crescimento <i>in vitro</i> de plântulas assépticas	23
2.2.2 Multiplicação <i>in vitro</i>	26
3 CAPÍTULO I.....	29
3.1 Introdução	30
3.2 Materiais e métodos	31
3.2.1 Desinfestação superficial de sementes de grápia.....	31
3.2.2 Efeito do meio de cultura no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de grápia	33
3.2.3 Influência da luminosidade e das concentrações de ágar e sacarose no estabelecimento <i>in vitro</i> de grápia	33
3.2.4 Condições de cultivo.....	34
3.2.5 Análise estatística	34
3.3 Resultados e discussão	35
3.3.1 Desinfestação superficial de sementes de grápia.....	35
3.3.2 Efeito do meio de cultura no crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de grápia	40
3.3.3 Influência da luminosidade e das concentrações de ágar e sacarose no estabelecimento <i>in vitro</i> de plântulas de grápia	42
3.4 Conclusão	45
Referências Bibliográficas.....	45
4 CAPÍTULO II.....	50
4.1 Introdução	51
4.2 Materiais e métodos	52
4.2.1 Efeito da posição de coleta e do BAP.....	53
4.2.2 Efeito do BAP e do carvão ativado	53
4.2.3 Efeito da KIN e do carvão ativado.....	54
4.2.4 Conservação <i>in vitro</i> de microcepas	54
4.2.5 Condições de cultivo.....	55
4.2.6 Análise estatística	55
4.3 Resultados e discussão	55

4.3.1 Efeito da posição de coleta e do BAP	55
4.3.2 Efeito do BAP e do carvão ativado	58
4.3.3 Efeito do KIN e do carvão ativado.....	64
4.3.4 Conservação <i>in vitro</i> das microcepas	66
4.4 Conclusão	70
Referências Bibliográficas.....	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
Apêndice A.....	84

1 INTRODUÇÃO

Apesar da constante expansão dos plantios comerciais de espécies exóticas de rápido crescimento, a crescente demanda por madeira para os mais diversos fins vem aumentando a pressão sobre espécies arbóreas nativas, o que contribui para a conservação dessas espécies (FERREIRA, 2000). No que se refere à demanda por madeiras de alta qualidade, espécies nativas são preferidas, justificando investimentos em pesquisa e a produção comercial dessas espécies em larga escala (FICK et al., 2007).

A produção de mudas de espécies arbóreas nativas foi impulsionada pela publicação, em 2001, da Medida Provisória 2.166-67 que definiu obrigatoriedade na reposição da reserva legal de propriedades rurais. No estado de São Paulo, o Decreto Estadual 46.113/01 e as Resoluções da Secretaria do Meio Ambiente do estado (SMA 21/01 e SMA 47/03) deliberaram regras para as atividades de restauração florestal fundamentadas no aumento da diversidade e riqueza das espécies a serem plantadas, assim como da qualidade genética das mudas. Dessa forma, essas mudanças geraram aumento na demanda por mudas de espécies nativas, afetando fortemente o setor de produção de mudas (LORZA et al., 2006).

Diversas empresas do setor florestal têm investido na produção de mudas, assim como em plantios de espécies nativas. Considerando os avanços obtidos na produtividade e qualidade das mudas de espécies exóticas, acredita-se que o mesmo pode-se obter para as nativas, para as quais a pesquisa ainda é incipiente. Portanto, o domínio das técnicas de manejo e o desenvolvimento tecnológico necessário para impulsionar a cadeia produtiva de espécies nativas demandarão de muito tempo, por se tratar de espécies de ciclo longo devido ao lento crescimento.

A grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.) é uma espécie nativa do Rio Grande do Sul, considerada nobre pelas características da madeira e prioritária nas ações relativas à conservação *in situ* e *in vitro* em função da sua relevante importância ecológica e econômica e por se tratar de uma espécie vulnerável a extinção (SEMA, 2006). No entanto, a produção de muda

de grápia é dificultada, especialmente, pelo fato das sementes apresentarem tegumento resistente, exigindo tratamentos específicos de quebra de dormência para uniformizar o processo de germinação. Além disso, a produção de mudas de grápia tem sido limitada pela frutificação irregular e a dificuldade de coleta das suas sementes, em decorrência das árvores atingirem altura de até 35 m (CARVALHO, 2003).

Nas últimas décadas, o emprego da cultura de tecidos tem possibilitado a multiplicação de diversas espécies arbóreas (GUERRA et al., 1999). Entre as técnicas utilizadas na cultura de tecidos destacam-se a micropropagação, a microenxertia, a conservação de germoplasma e a cultura de embriões, sendo a escolha determinada pela disponibilidade de material vegetativo, pelos recursos financeiros designados à pesquisa, entre outros (GUERRA; NODARI, 2006). A micropropagação destaca-se na área florestal pela ampla possibilidade de aplicação para a conservação de germoplasma *in vitro*, como ferramenta auxiliar em programas de melhoramento e multiplicação de clones superiores, para a limpeza clonal por meio da obtenção de culturas livres de microorganismos patogênicos e, ainda, por servir de base para outras técnicas biotecnológicas (PENCHEL et al., 2007, XAVIER et al., 2009).

Tendo em vista a redução das populações naturais de grápia, ações que envolvam a produção de mudas e o enriquecimento de áreas florestais, são imprescindíveis para delinear estratégias que visem à conservação, o manejo sustentado e o melhoramento genético dessa espécie. Com base na literatura, fica evidente a carência de estudos ligados às técnicas de propagação vegetativa de grápia visando à produção de mudas em larga escala e de alta qualidade genética e fitossanitária, características que se constituem de ponto de partida para o estabelecimento de povoamentos comerciais uniformes e de alta produtividade.

Baseado nas prerrogativas de que a grápia apresenta limitações fisiológicas naturais que dificultam a produção de mudas via seminal e das vantagens da micropropagação, os objetivos do presente trabalho foram investigar métodos para o estabelecimento e crescimento de plântulas assépticas, bem como para a multiplicação de brotos e conservação *in vitro* de microcepas dessa espécie.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Descrição da espécie

A grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.) pertence à família Fabaceae e apresenta duas variedades: *A. leiocarpa* var. *leiocarpa* (Vog.) J. F. Macbr. e *A. leiocarpa* var. *mollaris* (Spreng.) Toepen (RIZZINI, 1971). Outra classificação leva em consideração as características morfológicas de seus frutos e sementes, que além da distribuição geográfica, as classificariam como duas espécies distintas: *Apuleia leiocarpa*, de ocorrência nos estados do Sul do Brasil, enquanto *Apuleia mollaris* apresenta dispersão mais ampla, sendo o Estado do Paraná o limite entre as duas espécies (HERINGER; FERREIRA, 1973).

Árvore caducifólia, a grápia atinge altura de 2 a 15 metros na região Nordeste, e até 35 m e 100 cm de diâmetro à altura do peito (DAP) na idade adulta, na região Sul do Brasil. A espécie apresenta tronco irregular a cilíndrico, copa larga, ramificada e não muito densa (CARVALHO, 2003). A casca apresenta escamas delgadas que desprendem facilmente em placas rígidas em forma de conchas, deixando cicatrizes características e tornando-a inconfundível na floresta (KLEIN, 1982).

A grápia é uma leguminosa que, originalmente, possuía ampla distribuição geográfica, estando presente desde alguns estados do Nordeste brasileiro até a Argentina e o Uruguai (RIZZINI, 1971). No Rio Grande do Sul, a grápia ocorre particularmente na ampla bacia do Rio Jacuí (REITZ et al., 1988), sendo que, atualmente, apresenta dispersão desuniforme, em virtude da intensa devastação das matas do Estado, o que a tornou vulnerável à extinção (SEMA, 2006).

A grápia é classificada como secundária inicial em estudo realizado no Rio Grande do Sul (VACCARO et al., 1999). Espécies desse estágio sucessional apresentam características similares às pioneiras, no entanto, mais tolerantes ao sombreamento. No Sul, a grápia ocorre no estrato emergente da Floresta Estacional Decidual, especialmente no Vale do Alto Uruguai e bacia do rio Jacuí, até a formação Baixo-Montana (KLEIN, 1984; TABARELLI, 1992; VACCARO et al., 1999). Com relação à regeneração, a grápia pode ser plantada em plantio misto com

espécies pioneiras, a pleno sol, para melhoria do fuste, ou ainda, em linhas de florestas secundárias (MAIXNER; FERREIRA, 1976).

Planta monóica polinizada especialmente por abelhas, no Rio Grande do Sul, a floração da grápia ocorre, geralmente, de agosto a outubro. Os frutos amadurecem de novembro a abril e as sementes são dispersas pelo vento (CARVALHO, 2003). Quanto à produção de sementes, a grápia apresenta irregularidade, levando dois ou mais anos para se obter safra regular ou satisfatória (MATTOS; GUARANHA, 1983). A germinação das sementes dessa espécie é lenta, de 20 a 40 dias, além de ser desuniforme e inferior a 60% (LORENZI, 2002) em decorrência da presença de tegumento duro e impermeável à água, característica comum em espécies leguminosas (CARVALHO; NAKAGAWA, 1983). Sem a aplicação de tratamentos pré-germinativos, a germinação média das sementes de grápia varia de 13 a 30% (SOUZA et al., 1994). As sementes são ortodoxas, com longevidade de aproximadamente dois anos (EIBL et al., 1994). Em estudo realizado por Amaral et al. (1988), após a coleta as sementes de grápia apresentaram germinação de 96%, passando para 72 a 85% de germinação nas sementes armazenadas por 19 meses em sacos de papel, em câmara seca, à temperatura ambiente e umidade relativa de 50%.

A grápia é espécie típica do Rio Grande do Sul (RS), reconhecida pela qualidade da madeira, potencial apícola, medicinal, paisagístico e florestal (FELIPPI, 2010). A madeira apresenta boa durabilidade natural quando expostas às intempéries, exceto em condições de elevada umidade (CELULOSA ARGENTINA, 1975). É indicada para a construção de estruturas externas, construção civil, assim como em trabalhos de decoração e em revestimentos interiores. A espécie também é indicada para tanoaria, sendo usada especialmente em barris de cerveja (PEREIRA; MAINIERI, 1957).

2.2 Micropropagação

A micropropagação é uma ferramenta importante para a multiplicação de diversas espécies arbóreas de importância econômica ou que se encontram em extinção (TONON et al., 2001). Técnicas baseadas na micropropagação de plantas

podem ser empregadas com sucesso para a propagação massal de um genótipo, visando à conservação e o melhoramento genético (THORPE; KUMAR, 1993). Apesar de ser uma técnica dispendiosa em termos de mão de obra, equipamentos e laboratório, a micropropagação resulta em maior relação custo-benefício no processo de produção de mudas. Possibilita a realização de pesquisas de apoio às diferentes áreas da biologia, tais como genética, fitopatologia e fisiologia vegetal (CID; TEIXEIRA, 2010). Entre as técnicas de cultura de tecidos, a micropropagação tem se destacado, especialmente por ser mais prática e de maior impacto (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), pois permite a obtenção de plantas de difícil propagação e de ciclos de vida longos, em curto período de tempo. Além disso, a micropropagação possibilita a produção de mudas com alta qualidade sanitária durante todo o ano, assim como permite elevada taxa de multiplicação de plantas geneticamente idênticas (SERAFINI et al, 2001).

A micropropagação é uma opção para garantir o aproveitamento de sementes disponíveis em pequenas quantidades ou coletadas de frutos imaturos (RODRIGUES et al., 1998). Essas sementes poderão ser estabelecidas *in vitro* e posteriormente servir de fonte de explantes para a microrpopagação. A germinação das sementes é maior quando estas são mantidas em condição de sala de crescimento se comparado ao ambiente de casa de vegetação, em virtude do maior controle da temperatura e luminosidade (PRAKASH et al., 1999; PIO et al., 2001).

A utilização de explantes provenientes de plantas adultas tem a vantagem de propagar somente genótipos selecionados (BHOJWANI; RAZDAN, 1983). No entanto, o uso desse tipo de material apresenta a dificuldade do estabelecimento *in vitro*, pois são mais sujeitos a infecção por microorganismos de difícil eliminação (MELO et al., 1998), quando comparados a explantes de plântulas estabelecidas *in vitro*. Aliado a esse fator, explantes de plantas adultas de espécies arbóreas apresentam, geralmente, tecidos de baixa capacidade morfogenética (TRIGIANO et al., 1992). Para algumas espécies lenhosas, estacas de mudas juvenis, provenientes de sementes, enraízam facilmente, enquanto outras, provenientes de plantas mais velhas enraízam esporadicamente ou não enraízam (ZOBEL; TALBERT, 1984). Além do aumento as porcentagens de enraizamento, propágulos juvenis são competentes para o enraizamento e respondem rapidamente a formação de raízes de maior qualidade (GOMES, 1987). Assim, uma das mais consistentes repostas da maturação em plantas lenhosas tem sido a transição da alta para a baixa

capacidade de enraizamento de estacas caulinares e foliares (HACKETT, 1987; ELDRIDGE et al., 1994).

Plântulas obtidas da germinação *in vitro* de sementes podem ser fracionadas e subcultivadas, visando à organogênese. Segmentos nodais e microcepas isolados de plântulas germinadas *in vitro* correspondem a genótipos desconhecidos, podendo sua propagação ser ou não de interesse. Contudo a vantagem desse tipo de material é elevada disponibilidade de explantes assépticos e de alta capacidade de crescimento e resposta à aplicação de fitorreguladores (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A utilização de explantes provenientes de plântulas estabelecidas *in vitro* torna a micropropagação de espécies lenhosas uma técnica mais viável sob ponto de vista técnico, experimental e fisiológico (NOLETO; SILVEIRA, 2004), se comparado a explantes retirados de plantas adultas.

2.2.1 Germinação e crescimento *in vitro* de plântulas assépticas

Durante o estabelecimento *in vitro*, diversos fatores podem afetar o poder germinativo das sementes e promover a formação de plântulas anormais, dentre eles, a presença de microrganismos, especialmente fungos e bactérias (MARTINS-CORDER; BORGES JUNIOR, 1999). Portanto, métodos de desinfestação devem ser eficazes, proporcionando a eliminação de agentes patogênicos e o estabelecimento de plantas assépticas.

Diversos tratamentos para desinfestação de sementes têm sido utilizados em espécies arbóreas, incluindo-se o cloreto de mercúrio, o ácido clorídrico, o cloreto de benzalcônico, o peróxido de hidrogênio e, os mais comumente utilizados, o hipoclorito de cálcio e de sódio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O álcool 70% é frequentemente usado para a pré-desinfestação das sementes, para eliminar bolhas de ar e parte dos lipídeos, aumentando assim o contato do desinfestante com o material vegetal (MATEO-SAGASTA, 1990).

O hipoclorito (de cálcio ou sódio) é amplamente utilizado na assepsia superficial de explantes, por ser facilmente removível durante a lavagem com água. Além da eficiência como agente desinfetante, o hipoclorito pode atuar como estimulante da germinação, em razão da capacidade de estimular a atividade da α -

amilase devido ao aumento da quantidade dessa enzima na semente, ou ainda, pelo fato de promover a quebra da dormência das sementes de algumas espécies (KANEKO; MOROHASHI, 2003; MIYOSHI; MII, 1998). O cloreto de mercúrio (HgCl_2) também tem sido utilizado na assepsia externa de explantes (CID; TEIXEIRA, 2010), no entanto é altamente tóxico, requerendo especial atenção na manipulação e no armazenamento do produto, apesar de ser utilizado em concentrações inferiores a do hipoclorito (DUTRA et al., 2009).

Além da desinfestação, outros fatores estão envolvidos no estabelecimento de um protocolo eficiente de regeneração *in vitro*, entre os quais se destacam a espécie, o tipo de explante, os tipos de meio de cultura e de fitohormônios, a concentração de sacarose e de ágar, as condições de iluminação dos cultivos, entre outros (ZHANG et al., 2003). Os meios de cultura utilizados nos estádios de estabelecimento *in vitro* de plântulas possuem macronutrientes, micronutrientes, carboidratos (geralmente a sacarose), e compostos orgânicos (tais como vitaminas e aminoácidos). A escolha do meio de cultura ideal é imprescindível para a viabilização da micropropagação, pois além de fornecer os nutrientes necessários, preconiza o padrão de crescimento das plantas *in vitro* (THORPE et al., 1991; CALDAS et al., 1998).

Os meios nutritivos são formulados para atender às necessidades nutricionais da espécie (MANTOVANI; FRANCO, 1998). O meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) têm sido as formulações mais utilizadas para esta finalidade. O meio de cultura MS apresenta altas concentrações de sais, sobretudo os íons nitrato e amônio, quando comparado a outras formulações salinas (MURASHIGE; SKOOG, 1962; GEORGE, 1996). O meio de cultura WPM possui menores concentrações de sais (especialmente nitrogênio e potássio) se comparado ao meio de cultura MS, sendo originalmente desenvolvido para plantas lenhosas (LLOYD; McCOWN, 1980; SAADAT; HENNERTY, 2002).

A sacarose é essencial para o crescimento das plantas, em decorrência da limitada fotossíntese realizada por plantas mantidas *in vitro*. Este componente é um dos carboidratos mais usados na preparação dos meios de cultura, com concentração que varia de 2 a 3%, podendo, eventualmente, ser usada em concentrações maiores, chegando a 6% (CID; TEIXEIRA, 2010).

O ágar é um polissacarídeo de alto peso molecular utilizado na cultura de tecidos para dar sustentação aos explantes e às plantas mantidas *in vitro*. A

concentração de ágar no meio de cultura deve ser considerada, pois em altos níveis dessa substância podem afetar a disponibilidade e a difusão dos demais componentes, além de atuar como osmorreguladores e no efeito do condicionamento mátrico (semente x matriz sólida x água) (CID; TEIXEIRA, 2010; QUEIROGA et al., 2009).

O carvão ativado tem sido incorporado ao meio de cultura para melhorar o crescimento ou promover a organogênese dos explantes, além de funcionar como um antioxidante (PAN; STADEN, 1998). Esse antioxidante possui propriedades adsorventes dos exsudados fenólicos, além da capacidade de fixar cobre. O acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície excisada modifica a composição do meio de cultura e, conseqüentemente, a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000). Sabe-se que tal reação é desencadeada no processo de senescência ou por injúria dos tecidos (ZHOU et al., 2003). Os compostos fenólicos sofrem oxidação pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas que, normalmente, inibem o crescimento dos explantes, ou ainda, promovem a morte dos mesmos (SATO et al., 2001).

Além dos componentes do meio de cultura, a luz, a temperatura e a disponibilidade de água são fatores desencadeadores e reguladores da germinação (BAI; ROMO, 1995). Com relação à luz, as sementes que germinam sob condições de luminosidade são chamadas fotoblásticas positivas, enquanto aquelas nas quais a germinação é inibida pela luz são chamadas fotoblásticas negativas. As sementes que não apresentam sensibilidade à luz são chamadas de indiferentes (VÁSQUES-YANES; OROZCO-SEGOVIA, 1993; BEWLEY; BLACK, 1994, MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1989).

A luz é um fator físico que desencadeia sinais internos de ativação ou inativação de vias metabólicas nas sementes e nas plantas de algumas espécies (BHATTACHARYA; KHUSPE, 2001; KERBAUY, 2008). Existe nas sementes e em outras partes da planta, um pigmento denominado fitocromo, que se trata de uma cromoproteína solúvel responsável pela fotorreação que controla a germinação (TAIZ; ZEIGER, 2004). O fitocromo ativo é responsável pela expressão gênica da síntese de giberelina (GA), que é promotora da germinação, enquanto que o fitocromo inativo é responsável pela síntese de ácido abscísico (ABA), que inibe a germinação (FLOSS, 2004). Além disso, a luz regula a transição da condição

heterotrófica do embrião, dependente das reservas nutritivas, para o estágio autotrófico da plântula (KERBAUY, 2008). Sendo assim, a identificação da condição ótima de germinação das sementes e de desenvolvimento das plântulas é importante para agregar informações e adequar os protocolos de estabelecimento *in vitro* de plântulas de grápia, para que possam servir como material para a propagação *in vitro*.

Como medida, a porcentagem de germinação ou germinabilidade expressa a porcentagem de sementes germinadas em relação ao número de sementes dispostas a germinar sob determinadas condições experimentais. Podem existir lotes ou sementes que germinam mais rapidamente e outras mais lentamente. Nesses casos, medidas que quantificam a germinação informando quanto tempo foi necessário para que ocorresse a emergência são mais indicados, dando ao processo um caráter cinético e uma avaliação do vigor das sementes. Entre as avaliações utilizadas destacam-se o tempo médio de germinação (TMG) e o índice de velocidade de germinação (IVG) (BORGHETTI; FERREIRA, 2004; MAGUIRE, 1962).

O tempo médio de germinação é calculado com base no número de sementes germinadas em cada avaliação, multiplicado pelo respectivo tempo para a germinação, dividindo o resultado pelo número total de sementes germinadas ao final do teste (SILVA; NAKAGAWA, 1995). Já o índice de velocidade de germinação é obtido baseado na soma do número de sementes germinadas, em cada avaliação, dividido pelo respectivo tempo (SANTANA; RANAL, 2004). Ambos os testes são baseados no pressuposto de que sementes mais vigorosas germinam mais rapidamente (VIEIRA; CARVALHO, 1994). Quanto menor for o tempo médio, maior será a velocidade de germinação das sementes, ou seja, menores valores de TMG correspondem a maiores valores de IVG e representam um lote de sementes de alto vigor (NAKAGAWA, 1999).

2.2.2 Multiplicação *in vitro*

A multiplicação é a segunda fase da micropropagação de plantas, em que os explantes já possuem um crescimento uniforme e adequado. Sendo assim, o

principal propósito dessa fase é a multiplicação das gemas ou das microestacas, para posterior enraizamento e aclimatização (HARTMANN et al., 2002). Além disso, a multiplicação também é necessária para a conservação *in vitro* de um determinado genótipo.

O explante, parte da planta utilizada na multiplicação, deve apresentar capacidade morfogênica e totipotencial (VASIL; HILDEBRANDT, 1965) e pode ser obtido de raízes, hipocótilos, epicótilos, cotilédones, folhas, flores, grãos de pólen, embriões, óvulos, nós e gemas axilares ou apicais, sendo a escolha influenciada pela disponibilidade do material, pelos níveis de contaminação, pela juvenilidade e condição fisiológica da planta matriz (CID; TEIXEIRA, 2010). Além disso, para a escolha do explante, aspectos como o nível de diferenciação do tecido utilizado, a finalidade da multiplicação e a capacidade para se adequar às condições *in vitro* devem ser considerados, sendo preferidos os tecidos que contenham maior proporção de tecido meristemático, por apresentar maior totipotência (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A utilização de segmento nodal para a multiplicação *in vitro* é uma prática comum, baseada na indução do crescimento e proliferação de gemas vegetativas axilares pré-formadas, sendo considerado um método direto de regeneração de plantas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Já microcepas de origem seminal e mantidas *in vitro* para produção e fornecimento de brotos adventícios não são habitualmente utilizadas, mas apresentam grande potencial para esse fim. Estudos de microestaquia voltados para a conservação de microcepas de louro-pardo mostraram que esta técnica apresenta potencial de utilização na micropropagação, tendo como principal vantagem o aumento da taxa de multiplicação e a possibilidade de conservação *in vitro* de clones (FICK et al., 2007). Para a conservação, as microcepas são inoculadas em frascos contendo meio de cultura suplementado com sacarose, agente geleificante e acrescido ou não de fitorreguladores, sendo mantidos em ambiente asséptico e com condições adequadas de luz e temperatura.

Os meios de cultura utilizados na fase de multiplicação são similares aqueles utilizados para o crescimento *in vitro*, contendo nas formulações macronutrientes, micronutrientes, carboidratos, geralmente a sacarose, e alguns compostos orgânicos como vitaminas e aminoácidos. Reguladores vegetais são adicionados ao meio de cultura para auxiliar o crescimento e também são importantes no direcionamento da resposta do desenvolvimento dos propágulos (HARTMANN et al., 2002). Nesta fase

são preferidas as citocininas, as quais são empregadas para formação de brotos, devido à quebra de dominância apical que aumenta a taxa de multiplicação. Deste modo, ocorre um grande número de brotações por meio do crescimento de meristemas laterais (SRISKANDARAJAH et al., 1982; HU; WANG, 1983).

Entre as citocininas, as mais utilizadas são o BAP (6-benzilaminopurina), KIN (cinetina), o 2-iP (2-isopentenil adenina) e a ZEA (zeatina), as quais são empregadas para a formação de brotos. Outro grupo, o das auxinas (AIA- ácido indol acético, ANA- ácido naftaleno acético e AIB- ácido indol 3-butírico), pode ser utilizado também nessa fase, porém em baixas concentrações (HARTMANN et al., 2002). O BAP é o fitorregulador que tem se mostrado muito eficaz na multiplicação de diversas espécies lenhosas, além de possuir menor custo de aquisição (ARAGÃO et al., 2011).

Existe uma forte relação entre as citocininas e auxinas, que controlam o desenvolvimento vegetal atuando diretamente na definição dos meristemas e, assim, no tipo de órgão a ser formado. As plantas mantêm os meristemas apicais e radiculares durante toda a vida, possibilitando uma organogênese continuada (SKOOG; MILLER, 1957). Existem importantes evidências de que o efeito diferencial de auxinas e citocininas na indução de caules e raízes são importantes para o desenvolvimento da planta, visto que esses órgãos possuem funções complementares para a sua sobrevivência (PERES; KERBAUY, 2004). Portanto, o balanço entre as quantidades de citocininas exógenas e as auxinas endógenas é muito variável, inclusive com o tipo de explante (BRUNETTE et al., 2006).

3 CAPÍTULO I

GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS DE GRÁPIA (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.)

Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar a germinação e o crescimento *in vitro* de plântulas de grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.). Em um primeiro experimento, sementes de grápia foram inicialmente submetidas a tratamento de superação de dormência com a imersão em ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado (95 - 98%) por 20 min., seguido de lavagem em água corrente por 5 min. Posteriormente, as sementes foram pré-desinfestadas por 30 s. em solução de etanol a 70%, seguido da desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) nas concentrações de 0; 2,5 e 5,0% de cloro ativo, durante 5, 10 e 15 min. O experimento foi um fatorial 3 x 3 (concentrações de NaOCl x tempos de imersão), no delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições de quatro sementes cada. Em intervalos de três dias, foi avaliado o número de sementes germinadas para o cálculo do tempo médio de germinação (TMG) e do índice de velocidade de germinação (IVG), até 30 dias após a inoculação. As porcentagens de germinação e desinfestação das sementes foram avaliadas aos 30 dias. No segundo experimento, plântulas assépticas de grápia foram transplantadas para tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM, MS ou $\frac{1}{2}$ MS. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com dez repetições de quatro sementes cada. Aos 15 dias em sala de crescimento, as plântulas foram avaliadas quanto à altura da parte aérea, o comprimento total das raízes e o número de segmentos nodais e de folhas. No terceiro experimento, sementes de grápia passaram por tratamento de superação de dormência, imersão em solução de etanol (70%) por 30 s. e inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM suplementado com 4, 5 ou 6 g L⁻¹ de ágar combinado com 10, 20 ou 30 g L⁻¹ de sacarose. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento sob duas condições de luminosidade: luz durante toda a fase de estabelecimento e escuro durante os sete primeiros dias após a semeadura. O experimento foi um fatorial 3 x 3 x 2 (concentrações de ágar x concentrações de sacarose x condição de luminosidade), no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de quatro sementes cada. Aos 15 dias foi avaliada a porcentagem de germinação, a altura da parte aérea, o número de folhas e entrenós, o comprimento total das raízes, o TMG e o IVG. Sementes de grápia submetidas a superação da dormência tegumentar com ácido sulfúrico (H_2SO_4), seguido da imersão em álcool 70%, não requerem o uso de hipoclorito de sódio para complementar a desinfestação. A conservação das culturas no escuro nos primeiros sete dias mantém o vigor das sementes e favorece o estabelecimento *in vitro* de plântulas assépticas de grápia. O meio de cultura não afeta o crescimento das plântulas de grápia, sendo que o mesmo pode ser suplementado com 10 g L⁻¹ de sacarose e 4g L⁻¹ de ágar.

Palavras-chave: Germinação. Desinfestação. Meio de cultura. Luminosidade. Ágar. Sacarose.

3.1 Introdução

A germinação *in vitro* de plântulas se baseia na obtenção de explantes mais adequados para a micropropagação, visando à obtenção de uma cultura livre de contaminantes e suficientemente adaptada às condições de cultivo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Nesse caso, a germinação *in vitro* é necessária para o estabelecimento e a produção de plântulas assépticas, as quais servirão de fonte de propágulos livres de contaminantes e com características juvenis, para que seja possível a condução da etapa de multiplicação e o posterior enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* dos explantes.

A germinação *in vitro* de sementes é uma das técnicas utilizadas para a obtenção de plântulas assépticas, sendo possível alcançar altas taxas de multiplicação, independente de condições climáticas, variações estacionais e de fatores bióticos, tais como agentes polinizadores, dispersores ou patogênicos (ANDRADE et al., 2000). Além disso, normalmente, a germinação *in vitro* permite maior germinabilidade das sementes, possivelmente em função das condições dos cultivos *in vitro* serem mais adequada do que as condições de viveiro (NOLETO; SILVEIRA, 2004).

O uso de sementes nesta etapa proporciona o estabelecimento, a conservação e a estocagem de germoplasma. Sendo assim a germinação *in vitro* evita perdas da variabilidade genética e aumenta as chances da existência de genótipos com explantes responsivos à regeneração, permitindo assim a seleção de genótipos de grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.). Procedimentos que visem eliminar microorganismos patogênicos são imprescindíveis na etapa de estabelecimento, uma vez que a contaminação por microorganismos muitas vezes impossibilita o desenvolvimento do explante (PIERIK, 1987). Para esse fim, compostos à base de cloro são comumente utilizados, entre os quais se destacam o hipoclorito de sódio e o de cálcio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Para algumas espécies, o uso dessas substâncias têm sido eficiente para a desinfestação de sementes (SOUZA et al., 2011; ROSA, 2009).

A obtenção de plantas sem sintomas de deficiência nutricional ou hídrica é um fator que deve ser considerado para o estabelecimento da cultura *in vitro*, possibilitando o fornecimento de propágulos que respondam melhor às condições do

meio de cultura (MURASHIGE, 1974). Os meios de cultura fornecem substâncias essenciais para o crescimento e controlam o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998). Diversos meios de cultura são utilizados para esta finalidade, sendo importante a identificação do meio de cultura que ofereça à espécie as melhores condições. Isso porque as diversas respostas morfogênicas *in vitro* apresentadas por diferentes espécies fazem com que seja necessário o estabelecimento de condições padronizadas de cultivo para cada uma delas, considerando as suas características genéticas, o tipo de explantes utilizado, entre outros fatores. Sendo assim, a obtenção de protocolos de desinfestação de sementes e a escolha adequada do meio de cultura para o estabelecimento *in vitro* de plântulas constituem-se de etapas relevantes para o sucesso da micropropagação (RADMANN et al., 2009).

Tendo em vista a importância do estabelecimento e produção de plantas assépticas de grábia fornecedoras de explantes competentes para a micropropagação, o objetivo desse trabalho foi avaliar a germinação e o crescimento *in vitro* de plântulas dessa espécie.

3.2 Materiais e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Núcleo de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas (MPVP), do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, no período de março a maio de 2012.

3.2.1 Desinfestação superficial de sementes de grábia

As sementes de grábia foram obtidas de viveiro comercial localizado em Ijuí (RS). A coleta foi realizada entre os meses de dezembro de 2010 e fevereiro de 2011, com posterior armazenamento das sementes em caixas de isopor e mantidas em câmara fria com temperatura de 5°C e umidade relativa em torno de 50%.

Conforme informações do viveiro, a germinação de sementes de grápia é inferior a 50%, quando mantidas por 24 h em água com temperatura ambiente. O início da emergência ocorre entre 20 a 40 dias após semeadura.

As sementes primeiramente foram tratadas com ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado (95 - 98%) por 20 min., agitadas a cada 5 min. com bastão de vidro, seguido de lavagem em água corrente por 5 min., conforme protocolo de superação de dormência tegumentar descrito por Nicoloso et al. (1997). Após quebra de dormência tegumentar, as sementes foram pré-desinfestadas em solução de etanol a 70% por 30 seg., seguido da desinfestação em soluções de hipoclorito de sódio (NaOCl) nas concentrações de 0; 2,5 e 5,0% de cloro ativo, durante 5, 10 e 15 min. Ao término de cada tratamento, as sementes foram lavadas por três vezes com água destilada e autoclavada. As inoculações foram realizadas em frascos de vidro de 10 mL contendo aproximadamente 5 mL de meio de cultura composto por sacarose (30 g L^{-1}) e ágar (7 g L^{-1}). Os frascos foram fechados com filme de Poli Cloreto de Vinila (PVC) e mantidos por 30 dias em sala de crescimento.

O experimento foi um fatorial 3 x 3 (concentrações de NaOCl e tempo de imersão), no delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições de quatro sementes cada. Aos 30 dias foram avaliadas as porcentagens de germinação e desinfestação das sementes. Para obtenção do tempo médio de germinação (HARRINGTON, 1972) e do índice de velocidade de germinação (MAGUIRE, 1962), o número de sementes germinadas foi obtido em intervalos de três dias, até 30 dias após a inoculação. O critério considerado para contabilizar a germinação foi a protrusão da radícula nas sementes.

$$TMG = \frac{(G_1T_1 + G_2T_2 + \dots + G_nT_n)}{(G_1 + G_2 + \dots + G_n)} \quad (1)$$

Sendo:

TMG = tempo médio de germinação;

G = número de sementes germinadas;

T = tempo em dias.

$$IVG = \frac{G1}{T1} + \frac{G2}{T2} + \dots + \frac{Gn}{Tn} \quad (2)$$

Sendo:

IVG = índice de velocidade de germinação;

G = número de sementes germinadas;

T = tempo em dias.

3.2.2 Efeito do meio de cultura no crescimento *in vitro* de plântulas de grápia

Após a emissão da radícula, as plântulas de grápia livres de contaminantes foram transplantadas para tubos de ensaio contendo, aproximadamente, 7 mL de meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980), MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e ½ MS (MS com a concentração de sais minerais e vitaminas dividida pela metade), acrescidos de sacarose (30 g L⁻¹) e ágar (7g L⁻¹). O pH dos meios de cultura foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com dez repetições de quatro sementes cada. Aos 15 dias em sala de crescimento, as plântulas foram avaliadas quanto à altura da parte aérea (cm), o comprimento total das raízes (cm), e o número de segmentos nodais e folhas.

3.2.3 Influência da luminosidade e das concentrações de ágar e sacarose no estabelecimento *in vitro* de grápia

Após o tratamento de quebra da dormência tegumentar (NICOLOSO et al., 1997), as sementes foram desinfestadas em solução de etanol a 70% por 30 s. e inoculadas em tubos de ensaio contendo, aproximadamente, 7 mL de meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980), suplementado com 4, 5 ou 6 g L⁻¹ de ágar combinado com 10, 20 ou 30 g L⁻¹ de sacarose. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento e submetidos a duas condições de luminosidade: luz durante toda a

fase de estabelecimento e escuro, com auxílio de caixa de papelão, durante os sete primeiros dias após a semeadura.

O experimento foi um fatorial 3 x 3 x 2 (concentrações de ágar, concentrações de sacarose e condição de luminosidade), no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de quatro sementes cada. Aos 15 dias foi avaliada a porcentagem de germinação das sementes, a altura da parte aérea das plântulas (cm), o comprimento total das raízes (cm) e o número de segmentos nodais e folhas. O número de sementes germinadas foi obtido em intervalos de três dias, até 30 dias após a inoculação, possibilitando o cálculo do tempo médio de germinação (TMG) e do índice de velocidade de germinação (IVG), conforme descrito no item 3.2.1.

3.2.4 Condições de cultivo

Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h, sob intensidade luminosa de $14,3 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes.

3.2.5 Análise estatística

Para atender aos pressupostos da normalidade, os dados de porcentagem foram transformados para arcoseno $\sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância. As médias dos tratamentos com diferenças significativas ($P < 0,05$) foram comparadas pelo teste de Tukey ou regressão polinomial, com o auxílio do programa ESTAT (Unesp - Jaboticabal).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Desinfestação superficial de sementes de grápia

No estabelecimento *in vitro* de plântulas de grápia, foi verificado o início da germinação das sementes dois dias após a inoculação. Com seis dias, as sementes apresentaram 67,5% de germinação, e aos nove dias de inoculação, 78,6% de germinação e a presença do primeiro par de folhas verdadeiras nas plântulas (Tabela 1). Com 15 dias de inoculação, 82,5% das sementes haviam germinado, sendo observada a presença da parte aérea e raízes bem formadas. A germinação das sementes ocorreu até o vigésimo primeiro dia (84,3%) e, após esse período, não houve evidência de germinação. Resultado semelhante foi observado em sementes de teca (*Tectona grandis* L. f.), as quais iniciaram a germinação *in vitro* aos 5 dias, e aos 15 dias apresentavam germinação de 83,3% (FERMINO JUNIOR et al., 2009). Sementes de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A. C. Smith), espécie arbórea da Amazônia, iniciaram a germinação *in vitro* após oito dias de inoculação, apresentando 78% de germinação aos 30 dias (FERMINO JUNIOR et al., 2007).

Neste estudo, foi observado que 15,7% das sementes não germinaram, podendo este fato estar relacionado com a presença de substâncias inibidoras nas paredes celulares dos cotilédones (BEWLEY; BLACK, 1994), ou por influencia de fatores ambientais que resultaram na morte do embrião. Em copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.), espécie arbórea da mesma família da grápia, ocorre a presença de cumarina nas paredes celulares dos cotilédones da semente, que são substâncias fenólicas consideradas inibitórias da germinação (VÁLIO, 1973). Para fins comerciais, é interessante que as sementes germinem de forma homogênea, em curto espaço de tempo, possibilitando a produção uniformes de mudas (MELO et al., 1998). Neste estudo, apesar de algumas sementes de grápia se mostrarem inviáveis, houve elevada porcentagem de germinação, de forma homogênea e em curto período de tempo, o que é desejável quando se pretende a produção de um grande número de plântulas assépticas.

Tabela 1 – Número de sementes germinadas de grápia (*Apuleia leiocarpa*), tratadas com 0, 2,5 ou 5,0% de hipoclorito de sódio (NaOCl), por 5, 10 ou 15 min., avaliada a cada 3 dias em sala de crescimento. UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

Tratamento	Dias de avaliação										Total
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	
Testemunha	5	20	9	0	0	0	0	0	0	0	34
2,5%-5 mim	5	20	6	5	1	1	1	0	0	0	39
2,5%-10 mim	6	17	4	1	0	1	1	0	0	0	30
2,5%-15 mim	8	24	6	0	0	1	0	0	0	0	39
5%-5 mim	11	23	2	0	0	0	0	0	0	0	36
5%-10 mim	13	17	1	0	0	0	0	0	0	0	31
5%-15 mim	8	14	3	2	0	0	0	0	0	0	27
Total geral	54	135	31	8	3	3	2	0	0	0	236

Para a porcentagem de sementes germinadas, não houve influência das concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) e dos tempos de imersão ($P \leq 0,05$), aos 30 dias de avaliação. As sementes de grápia apresentaram uma média de germinação de 84,3%. Estes resultados sugerem que o NaOCl não afetou negativamente a porcentagem de germinação das sementes de grápia, independente do tempo de imersão. Apesar de não ter sido verificada diferença significativa entre os tratamentos, o uso de 5% de NaOCl proporcionou maior porcentagem de germinação das sementes, se comparada a solução de 2,5% de NaOCl (Tabela 2). O favorecimento da germinação das sementes imersas em solução com maior concentração de NaOCl, provavelmente, está relacionado à ação do hipoclorito de sódio nos processos metabólicos, a exemplo dos processos oxidativos, do ciclo das pentoses e da respiração, além de modificações nas propriedades das membranas celulares do tegumento ou no fornecimento de oxigênio adicional para a semente, auxiliando na quebra da dormência e aumentando a porcentagem de germinação (ROCHA, 2005; ZAIDAN; BARBEDO, 2004). Sementes de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) apresentaram germinação de 88% após imersão em NaOCl (NOLETO et al., 2010). Já com o aumento do tempo de imersão, houve ligeira redução da porcentagem de germinação, indicando que o tempo de imersão, provavelmente, afetou a germinação comparado com as concentrações de NaOCl.

Neste estudo, também foi possível confirmar a eficiência da aplicação do ácido sulfúrico (H_2SO_4) na quebra da dormência tegumentar de sementes de grápia.

Possivelmente esse tratamento permitiu maior aproveitamento das condições favoráveis oferecidas nos cultivos *in vitro*. Sementes de grápia embebidas em água deionizada por 16h, sem tratamento de superação da dormência tegumentar com ácido sulfúrico, apresentaram 9,4% de germinação aos 5 dias, e 32,1% de germinação aos 70 dias. Já com o tratamento de superação de dormência com o ácido sulfúrico houve 100% de germinação das sementes (NICOLOSO et al., 1997).

Tanto a concentração da solução de NaOCl quanto o tempo de imersão não afetaram a porcentagem de desinfestação das sementes de grápia aos 30 dias de avaliação. As porcentagens de desinfestação foram altas (superiores a 92,5%), determinando o sucesso do estabelecimento *in vitro* de plântulas assépticas de grápia, quando expostas ao tratamento de quebra de dormência tegumentar com ácido sulfúrico concentrado por 20 min. Considerando que o tratamento controle e a imersão em NaOCl por 15 min. não diferiram significativamente, isso indica que o tratamento com NaOCl para a assepsia de sementes de grápia é desnecessário. Acredita-se que durante o processo de superação da dormência tegumentar, parte do ácido sulfúrico penetre no tegumento da semente, promovendo efeito residual que, mesmo após lavagem em água corrente, contribuiu para a desinfestação das mesmas, resultando em baixa incidência de fungos e bactérias. Além disso, o etanol 70% utilizado na pré-assepsia do material é considerado um bom agente desinfestante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998) e tenha sido suficiente para complementar a desinfestação das sementes de grápia.

No geral, o hipoclorito de sódio apresenta papel fundamental na assepsia das sementes, pois além de ser eficiente na desinfestação também influencia positivamente a germinação, sendo que neste estudo o NaOCl não influenciou significativamente a germinação e nem a desinfestação das sementes de grápia. Sementes de guabijuzeiro (*Myrcianthes pungens* (Berg) Legr.) desinfestadas com hipoclorito de sódio nas concentrações de 4 e 6% por 20 min., apresentaram respectivamente 94 e 98% de desinfestação e 98 e 92% de germinação (SOUZA et al., 2011). Sementes de angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida* Benth (Brenan)) tratadas com NaOCl a 2,5% de concentração por 30 min., e 5,0% por 15 min., apresentaram maior porcentagem de desinfestação (60 e 50%, respectivamente) e as maiores porcentagens de germinação (80 e 85%, respectivamente) (NASCIMENTO et al., 2007). Existem poucos relatos que abordem a utilização do ácido sulfúrico como agente desinfestante, como verificado em sementes de cássia

(*Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn) que foram desinfestadas com ácido sulfúrico 96% por 45 min. e álcool a 80% (SADO, 2009). Em geral, o ácido sulfúrico é utilizado para a quebra da dormência das sementes, como utilizado neste trabalho, mas também foi eficaz na desinfestação das sementes por não ter sido necessária a utilização de NaOCl.

As sementes de grápia apresentaram tempo médio de germinação (TMG) de 5,8 dias (Tabela 3), independente da concentração de NaOCl e dos tempos de imersão. Sementes de louro-pardo (*Cordia trichotoma* Vell. Arrab. ex Steud.) inoculadas *in vitro*, apresentaram TMG de 13 dias no tratamento com água destilada durante 24 horas (FICK et al., 2007). Em sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* Wit.), os valores de TMG foram de 2,4 dias em sementes tratadas com ácido sulfúrico por 10 min. e de 5,8 dias em sementes imersas em água a 100 °C (OLIVEIRA, 2008). Na germinação *ex vitro* de sementes de pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb.) foi observado valores de TMG entre 13,7 e 22,7 dias, em diferentes tipos de substratos (ALVINO; RAYOL, 2007).

Tabela 2 – Porcentagem de germinação e desinfestação de sementes de grápia (*Apuleia leiocarpa*) tratadas com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0, 2,5 ou 5,0%, por 5, 10 ou 15 min., aos 30 dias em sala de crescimento. UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

Tempos de imersão (min.)	Porcentagem de germinação	Porcentagem de desinfestação
5	95,1 A	92,5 A
10	75,1 A	92,5 A
15	81,4 A	97,5 A
NaOCl ativo (%)	%G	%D
0 (controle)	86,4 A	97,5 A
2,5	77,9 A	96,9 A
5,0	89,7 A	93,1 A
Média	84,3	95,0
CV (%)	36,9	14,9

* Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Valores de TMG baixos, em germinação *in vitro*, possibilitam maximização da fase de estabelecimento de plântulas para uso na micropropagação. Quando se trata de produção de mudas *ex vitro*, baixos valores de TMG são igualmente

importantes, mas com enfoque no sentido de que plântulas que apresentam menor TMG tornam-se menos vulneráveis às condições adversas do meio, por emergirem mais rápido no solo e passarem menos tempo nos estádios iniciais de desenvolvimento (MARTINS et al., 1999).

Para o TMG, assim como para o índice de velocidade de germinação (IVG), verificou-se que os tratamentos com maiores concentrações de NaOCl (5%) estimularam o aumento do vigor das sementes quando comparado com aqueles nos quais se utilizou menor concentração de hipoclorito de sódio (2,5%) (Tabela 3). Para leucena (*Leucaena leucocephala*), o IVG foi de 22 dias em sementes tratadas com ácido sulfúrico, por 10 min. e de 4,8 dias para sementes imersas em água por 72 horas (OLIVEIRA, 2008). Sementes de pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale*), germinadas *ex vitro*, apresentaram valores de IVG de 1,29 a 0,43 dias, em diferentes substratos (ALVINO; RAYOL, 2007).

É possível que o TMG tenha sido influenciado pelo tempo de imersão das sementes e pela concentração da solução de hipoclorito de sódio. Entretanto, esse resultado não se confirmou com o índice de velocidade de germinação (IVG), visto que são grandezas inversamente proporcionais, em que quanto menor tempo médio de germinação e maior o índice de velocidade de germinação maior o vigor das sementes. Apesar destas diferenças, é possível considerar que o lote de sementes de grápia utilizado nestes experimentos é de alto vigor de germinação, medidos pelo TMG e IVG.

Tabela 3– Tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVG), expresso em dias, de sementes de grápia (*Apuleia leiocarpa*) tratadas com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0, 2,5 ou 5,0%, por 5, 10 ou 15 min., aos 30 dias em sala de crescimento. UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

Tempos de imersão (min.)	TMG (dias)	IVG (dias)
5	6,5	6,9
10	5,8	6,3
15	5,1	6,4
Concentrações de NaOCl ativo (%)	TMG (dias)	IVG (dias)
0 (controle)	6,3	6,0
2,5	6,9	6,3
5,0	4,7	6,8
Média	5,8	6,4

O estabelecimento *in vitro* inicia-se com a seleção dos explantes mais adequados para a micropropagação e termina com a obtenção de uma cultura livre de contaminantes e suficientemente adaptada às condições *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Nesse caso, o estabelecimento refere-se à produção de plântulas *in vitro*, as quais servirão de fonte de propágulos livres de contaminantes e com características juvenis, facilitando a condução das etapas seguintes da micropropagação.

Para grápia, o tratamento para a superação da dormência com H₂SO₄ associado à desinfestação das sementes em etanol 70% possibilitou a obtenção de grande número de plântulas assépticas, as quais poderão ser utilizadas como fonte de explantes, permitindo o desenvolvimento de protocolos de micropropagação para a espécie. Explantes provenientes de plântulas estabelecidas *in vitro* são comumente utilizados na micropropagação, especialmente por apresentarem tecidos juvenis e com pronta capacidade de resposta morfogênica à aplicação de fitorreguladores (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

3.3.2 Efeito do meio de cultura no crescimento *in vitro* de plântulas de grápia

Para a altura da parte aérea, o comprimento da raiz e o número de segmentos nodais e de folhas, não houve diferença significativa entre os tratamentos. A altura média da parte aérea foi de 7,5 cm e do sistema radicular de 7,4 aos 15 dias de cultivo independente do meio de cultura utilizado (Tabela 4). Por outro lado, plântulas de louro-pardo (*Cordia trichotoma*) estabelecidas em meio de cultura WPM apresentaram crescimento da parte aérea (1,6 cm) e da raiz (7,3 cm) significativamente maior se comparadas àquelas mantidas em meio de cultura ½ MS (0,7 e 1,3 cm respectivamente) (FICK et al., 2007). Comparado ao meio de cultura MS, o meio de cultura WPM também se mostrou mais adequado para o estabelecimento *in vitro* de plântulas de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.), onde foi observado maior número de nós por broto (4,94) e maior enraizamento dos explantes (66,8%) (FLÔRES, 2007). No estabelecimento *in vitro* de plântulas de teca (*Tectona grandis*), os meios de cultura WPM e MS proporcionaram as maiores porcentagens de germinação das sementes (60 e

83,3%, respectivamente) (FERMINO JUNIOR et al., 2009). O meio de cultura WPM também se mostrou superior ao MS durante a fase de indução de brotos em explantes de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg.) (RIBAS et al., 2005) e na indução e alongamento de brotos em explantes de caixeta (*Scheffera morototoni* (Aubl.) Maguire, Steyerm. & Frodin.) (MANTOVANI et al., 2000).

Na micropropagação, plântulas que desenvolvam maior número de segmentos nodais ou gemas axilares como fonte de propágulos são preferidas, visto que esses tipos de propágulos apresentam menores variações somaclonais e epigenéticas (TORRES et al., 1999). Neste estudo, foi observado que o meio de cultura não influenciou o número de segmentos nodais das plântulas de grápia (Tabela 4), podendo ser utilizados os meios WPM, MS ou ½ MS para o crescimento *in vitro* de plântulas dessa espécie.

Tabela 4 – Altura da parte aérea, comprimento da raiz, número de segmentos nodais e folhas de plântulas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) estabelecidas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), ½ MS e WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980), avaliadas aos 15 dias. UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

Tratamento	Altura da parte aérea (cm)	Comprimento da raiz (cm)	Número de segmentos nodais	Número de folhas
WPM	7,7 A*	8,0 A	1,9 A	4,5 A
MS	7,4 A	7,0 A	1,8 A	4,1 A
½ MS	7,4 A	7,3 A	1,7 A	4,4 A
Média	7,5	7,4	1,8	4,3
CV (%)	4,4	9,3	7,6	6,3

* Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Apesar das diferenças na proporção e composição salina entre os meios de cultura MS e WPM, não foram encontradas diferenças no crescimento *in vitro* das plântulas de grápia. O meio de cultura WPM teve sua formulação desenvolvida especialmente para espécies lenhosas, apresentando 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS (MELO et al., 1999). As fontes de nitrogênio, o nitrato de amônio (NH_4NO_3) e o nitrato de potássio (KNO_3), afetam o balanço dos íons. Baixas concentrações de nitrogênio na forma amoniacal estimulam o crescimento *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Melo et al. (1999)

verificaram as melhores respostas de explantes no estabelecimento *in vitro* de aceloreira (*Malpighia emarginata* DC.) em meio de cultura WPM se comparado àqueles cultivados em meio de cultura MS. Os autores sugerem que a concentração salina (NH_4/NO_3) e de sulfato (SO_4) tiveram grande influência no desenvolvimento das brotações. O enxofre na forma de sulfato, em maior concentração no meio WPM, influencia o metabolismo das células vegetais (MENGEL; KIRKBY, 1987). Além disso, as soluções de sais e açúcares dos meios de cultura exercem efeito nutritivo, mas também influenciam o crescimento celular e a morfogênese, devido às propriedades osmóticas (GEORGE, 1993). O excesso de água pode acelerar a deterioração, enquanto que a falta pode interromper processos metabólicos importantes (MELLO; BARBEDO, 2007). Além disso, o meio de cultura WPM possui maior quantidade da vitamina tiamina – HCl se comparado ao meio de cultura MS. A tiamina é apontada como uma substância benéfica para a multiplicação *in vitro*, possibilitando maior indução de brotos em explantes de espécies arbóreas (MANTOVANI; FRANCO, 1998).

3.3.3 Influência da luminosidade e das concentrações de ágar e sacarose no estabelecimento *in vitro* de plântulas de grápia

Não houve interação significativa entre as concentrações de ágar, as concentrações de sacarose e a condição de luminosidade no estabelecimento *in vitro* de plântulas de grápia, para todas as variáveis analisadas. Para o número de segmentos nodais e de folhas, e o comprimento das raízes não houve diferença significativa entre os tratamentos utilizados (Tabela 5). Já a altura da parte aérea das plântulas foi afetada pela condição de luminosidade até os sete dias após a semeadura. Sementes mantidas no escuro formaram plântulas com maior altura (8,8 cm), diferindo significativamente do tratamento formado por sementes expostas a luz (7,5 cm). A luz tem ação na fotodegradação de compostos inibidores de crescimento presentes no tegumento das sementes, os quais podem ser substâncias de natureza fenólica, que retardam os processos metabólicos, prejudicando o alongamento da parte aérea e do sistema radicular (VON-PINHO; KIKUTI, 2004; MARTINOTTO et

al., 2007). Apesar disso, a conservação das culturas de grápia no escuro nos primeiros sete dias resultou no aumento da altura da parte aérea.

Tabela 5 – Altura da parte aérea, número de segmentos nodais, número de folhas e comprimento total das raízes de plântulas grápia (*Apuleia leiocarpa*) obtidas de sementes mantidas no escuro e na luz, durante os sete primeiros dias de inoculação, independente das concentrações de sacarose e ágar. UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

Condição de luminosidade	Número de segmentos nodais	Número de folhas	Comprimento das raízes (cm)	Altura da parte aérea (cm)
Escuro	1,8 A*	3,6 A	8,7 A	8,8 A*
Luz	1,6 A	4,0 A	7,5 A	7,5 B
Média	1,7	3,8	8,1	8,15
CV (%)	16,5	12,4	7,2	8,6

* Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Quanto a germinação *in vitro*, as sementes de grápia foram indiferentes à presença ou ausência de luz (Tabela 6), o que está de acordo com os resultados obtidos por Henicka et al. (2006) estudando a germinação em câmara do tipo B.O.D. No entanto, a conservação das sementes de grápia no escuro durante a fase inicial de estabelecimento *in vitro* diminuiu o tempo médio de germinação e aumentou a velocidade de germinação, ou seja, favoreceu o vigor das sementes. Como a presença de luz favorece a germinação devido a fotodegradação de compostos inibidores presentes no tegumento (MARTINOTTO et al., 2007), sementes de grápia aparentemente não apresentam esses compostos ou apenas em níveis não prejudiciais. Assim, sementes de grápia devem ser mantidas no escuro durante os primeiros sete dias após a inoculação *in vitro*, pois a ausência de luz favorece a germinação. Cabe ressaltar que os valores de TMG e de IVG indicam um alto vigor da germinação das sementes de grápia.

O fato de não ter sido verificada diferença significativas entre as concentrações de ágar e de sacarose para todas as variáveis analisadas sugere que, para a suplementação do meio de cultura WPM, a menor concentração de ágar

e sacarose (4 g L⁻¹ e 10 g L⁻¹, respectivamente) são suficientes para o estabelecimento *in vitro* de plântulas de grápia.

Tabela 6 – Porcentagem de germinação, tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVG) de plântulas grápia (*Apuleia leiocarpa*) obtidas de sementes mantidas no escuro e na luz, durante os sete primeiros dias de inoculação, independente das concentrações de sacarose e ágar. UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

Condição lumíncia	Porcentagem de Germinação	TMG	IVG
Escuro	92,6 A*	3,6	15,1
Luz	85,1 A	5,0	11,2
Média	88,8	4,3	13,1
CV (%)	24,9	-	-

* Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Os resultados deste trabalho mostraram que sementes de grápia submetidas à quebra de dormência tegumentar (NICOLOSO et al., 1997) e desinfestadas em solução de etanol a 70%, não necessitam do tratamento com hipoclorito de sódio para a desinfestação. O hipoclorito de sódio teve influência apenas no aumento no vigor das sementes, com redução do tempo médio de germinação e aumento do índice de velocidade de germinação em concentrações mais elevadas de NaOCl. Com relação aos diferentes meio de cultura, não houve diferenças entre WPM, MS e ½ MS, indicando que estes são adequados para o estabelecimento *in vitro* de grápia. O meio de cultura WPM pode ser utilizado nas etapas seguintes da micropropagação, por não ter apresentado diferença significativa em relação ao meio MS e por ser mais diluído e, portanto, mais acessível do ponto de vista econômico. A condição de luminosidade nos primeiros sete dias de inoculação mostrou que a presença de luz afeta o vigor das sementes (maior TMG e menor IVG). Portanto, o escuro mantém o vigor das sementes e favorece o crescimento da parte aérea, resultando em maior altura.

3.4 Conclusão

Sementes de grábia submetidas a superação da dormência tegumentar com ácido sulfúrico (H₂SO₄), seguido da imersão em álcool 70%, não requerem o uso de hipoclorito de sódio para complementar a desinfestação. A conservação das culturas no escuro nos primeiros sete dias mantém o vigor das sementes e favorece o estabelecimento *in vitro* de plântulas de grábia. O meio de cultura não afeta o crescimento das plântulas de grábia, sendo que o mesmo pode ser suplementado com 10 g L⁻¹ de sacarose e 4 g L⁻¹ de ágar.

Referências Bibliográficas

ALVINO, F. de O., RAYOL, B. P. Efeito de diferentes substratos na germinação de *Ochroma pyramidale* (Cav. Ex Lam.) Urb. (Bombacaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 1, p. 71-75, jan-mar, 2007.

ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds**: physiology of development and germination. 2nd. ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

CALDAS, L. S., HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1998. p. 87-132.

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; NAGAO, E. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L. f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestalis**. Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 427-435, dez. 2009.

FERMINO JUNIOR, P. C. P. et al. Calogênese e organogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Sm.) da Amazônia Occidental: estabelecimento e regeneração de brotos. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 13, supl., p. 811-815, 2007.

FICK, T. A. et al. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plântulas de louro-pardo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 4, p. 343-349, out-dez, 2007.

FLÔRES, A. **Introdução ao cultivo *in vitro* de açoita-cavalo** (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini). 2007. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics, Edington, v. 1, p. 1-555, 1993.

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

HARRINGTON, J. F. 1972. Seed storage and longevity. In: T. T. Kozlowski (ed.) **Seed biology**. Academic Press, New York, p. 145-245.

HENICKA, G. da S. et al. Germinação de sementes de *Apuleia leiocarpa* (VOGEL.) J. F. MACBR.: temperatura, fotoblastismo e estresse salino. **Revista de Ciências Agro Ambientais**. Alta Floresta. v. 4, n. 1, p. 37-46, 2006.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Commercially Proceedings International Plant Propagator's Society**, Ashville, v. 30, p. 421-427. 1981.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H. **Cultura de tecidos de plantas lenhosas**. Santa Maria: Centro de Pesquisas Florestais, UFSM, 1998. 132p. (Série técnica; v. 12)

MANTOVANI, N. C. et al. Micropropagação de caixeta (*Scheffera morototoni*). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 47-61, 2000.

MARTINOTTO, C. **Embriogênese somática e isolamento de protoplastos de pequi**. 2007. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 106f, 2007.

MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J.; BOVI, M. L. A. Efeito da posição da semente no substrato e no crescimento inicial das plântulas de palmito-vermelho (*Euterpe espirotosantensis* Fernandes – Palmae). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 21, n. 1, p. 164-173, 1999.

MELLO, J. I. O.; BARBEDO, C. J. Temperatura, luz e substrato para germinação de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae - Caesalpinioideae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 645-655, 2007.

MELO de, M. F. et al. Estabelecimento do cultivo *in vitro* de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 1, p-102-107, 1999.

MELO, J. T. et al. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies nativas do Cerrado. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 195-243.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. Nutrient uptake and assimilation. In: **Principles of plant nutrition**. 4th Ed. Bern: International Potash Institute, 1987, cap.3, p.140-191.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, Columbus, v. 25, p. 135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, P. K. V. do. FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Parapiptadenia rigida* Benth (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 141-143, jul. 2007.
NICOLOSO, F. T. et al. Efeito de métodos de escarificação na superação da dormência de sementes e dois substratos na germinação e no desenvolvimento da grápia (*Apuleia leiocarpa*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 419-424, 1997.

NOLETO, L. G.; PEREIRA, M. de F. R.; AMARAL, L. I. V. do. Alterações estruturais e fisiológicas em sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. – Leguminosae – Caesalpinioideae submetidas ao tratamento com hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 32, n.1, p.045-052, 2010.

OLIVEIRA, A. B. de. Germinação de sementes de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.), var. K-72. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v. 8, n. 2, 2º semestre, 2008.

PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers, 343 p. 1987.

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.

RIBAS, L. L. F.; et al. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 517-524, 2005.

ROCHA, S. C. **Micropropagação da canjarana (*Cabralea canjerana*)**. 2005. 74f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ROSA, F. C. da. **Superação da dormência de sementes e cultivo *in vitro* de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 52 p. 2009.

SADO, M. **Efeito do 2,4-D na calogênese de *Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn (Leguminosae) e seus compostos de reserva**. 2009. Dissertação (Mestrado Biodiversidade e Meio Ambiente). Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2009. 90 p.

SOUZA, L. dos. S. de; et al. Desinfestação de sementes e multiplicação *in vitro* de guabijuzeiro a partir de segmentos apicais juvenis (*Myrcianthes pungens* O. Berg) D. Legrand. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 3, p. 691-697, Setembro 2011.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Embrapa/Brasília, v. 2, 517p. 1999.

VALIO, I. F. M. Effect of endogenous coumarin on the germination of seeds of *Coumarouna odorata* Aublet. **Journal of Experimental Botany**, v. 24, n. 2, p. 442-449, 1973.

VON-PINHO, E. V. R.; KIKUTI, A. L. **Portal do agronegócio do café: inibidores da germinação no espermoderma**. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=228>>. Acesso em: 25 dez. 2012.

Z Aidan, L. B. P.; Barbedo, C. J. Quebra de dormência em sementes. In: Ferreira, A. G., Borghetti, F. (Ed.) **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed. 2004. p.134-146.

4 CAPÍTULO II

MULTIPLICAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GRÁPIA (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.)

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a multiplicação de segmentos nodais e a conservação *in vitro* de microcepas de grápia. Segmentos obtidos de diferentes posições da plântula (basal, mediana e apical) foram inoculados em meio de cultura WPM acrescido 0; 2,2; 4,4; 6,6 ou 8,8 μM de 6-benzilaminopurina (BAP). O experimento foi um fatorial 3 x 5 (posição de coleta e concentrações de BAP), no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de três segmentos. Aos 30 dias os explantes foram avaliados quanto à presença ou não de calo, número e comprimento total dos brotos (cm), número de folhas, porcentagem de enraizamento e número e comprimento total das raízes (cm). Segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura WPM suplementado com 0; 2,2; 4,4; 6,6 ou 8,8 μM de BAP e de 0 e 1,5 g L^{-1} de carvão ativado. O experimento foi um fatorial 2 x 5 (carvão ativado e concentrações de BAP), no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de quatro segmentos. A avaliação foi realizada aos 30 dias para as mesmas variáveis descritas acima. Em outro experimento, segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura WPM acrescido de 0; 2,3; 4,6; 6,9 e 9,2 μM de cinetina (KIN) e de 0 e 1,5 g L^{-1} de carvão ativado. O experimento foi um fatorial 2 x 5 (carvão ativado e concentrações de KIN), no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de quatro segmentos. A avaliação foi realizada aos 30 dias para as mesmas variáveis descritas acima. O último experimento foi conduzido com plântulas assépticas de grápia submetidas à poda da parte aérea, formando as microcepas que foram transferidas para meio de cultura WPM com 0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 μM de BAP e de 0 e 1,5 g L^{-1} de carvão ativado. O experimento foi um fatorial 2 x 5 (concentrações de BAP e carvão ativado), no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de quatro microcepas. As microcepas foram avaliadas quanto à sobrevivência, a porcentagem de brotação, o número e comprimento total dos brotos e o número de segmentos nodais e de folhas aos 30 dias de cultivo. Após avaliação, as microcepas foram subcultivadas em meio de cultura WPM livre de citocinina e na presença de 1,5 g L^{-1} de carvão ativado, para a sua conservação, sendo avaliadas aos 30 dias para as mesmas variáveis. Segmentos nodais da base da plântula apresentaram maior número (1,9 brotos por explante) e maior comprimento (1,4 cm) dos brotos. O maior número de brotos (2,6 brotos por explante) foi obtido com a suplementação de 6,6 μM de BAP e sem carvão ativado. O carvão ativado reduziu a formação de calo nos explantes e favoreceu a porcentagem de enraizamento. A KIN não favoreceu a formação de brotos. Nas microcepas o maior número de brotos e de folhas foi obtido com carvão ativado (1,9 brotos por explante e 2,2 folhas respectivamente). A suplementação do meio WPM com 8,8 μM de BAP e sem carvão ativado resultou no maior número de brotos (3,3) após o subcultivo. Segmentos nodais e microcepas de origem seminal respondem satisfatoriamente a indução de brotos adventícios em meio de cultura WPM suplementado com BAP.

Palavras-chave: Segmento nodal. Microcepa. BAP. KIN. Carvão ativado.

4.1 Introdução

Os relatos existentes sobre a produção de mudas de grápia abordam, em sua maioria, a propagação por sementes. No entanto, essa forma de propagação apresenta restrições para a produção de mudas, sobretudo no que se refere à variabilidade genética das populações como resultado da reprodução sexual. Por outro lado, técnicas de propagação vegetativa, a exemplo da micropropagação, apresentam benefícios referentes à possibilidade de fixar componentes não-aditivos da variância genética e a produção massal de mudas a partir de genótipos superiores (BISOGNIN, 2011; GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

Inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos no intuito de tornar a micropropagação de espécies lenhosas acessível, sob ponto de vista tecnológico e econômico. Entretanto, o avanço dessas pesquisas tem sido limitado pela necessidade de desenvolvimento de protocolos eficientes para cada espécie e, até mesmo genótipos. Além disso, avanços biotecnológicos relativos à micropropagação de espécies lenhosas têm sido pouco expressivos, haja vista que estas espécies ainda não despertaram interesse para desenvolver pesquisa científica e tecnológica. Entretanto, existe reconhecido potencial da utilização da micropropagação na silvicultura clonal e na indústria de base florestal com espécies exóticas (PENCHEL et al. 2007, XAVIER et al. 2009).

A micropropagação é constituída de quatro fases: estabelecimento dos explantes em ambiente asséptico, multiplicação dos explantes, enraizamento das brotações e aclimatização das plantas (HARTMANN et al., 2002). Os explantes incluem diversos tecidos vegetais como folhas, gemas apicais ou axilares, segmentos nodais, dentre outros. A utilização de segmentos nodais permite a regeneração de plantas pela indução da proliferação de gemas vegetativas axilares pré-formadas (MANTOVANI et al., 2001). A proliferação de gemas axilares é o método mais utilizado na micropropagação de plantas lenhosas. Isso se deve ao fato do explante ser facilmente manipulado, pois, normalmente, apresentam maior tamanho se comparado aos demais tipos de explantes, e por originar, em geral, plantas geneticamente mais estáveis, já que o processo ocorre por morfogênese direta (BONGA, 1985).

A indução e expressão das possíveis respostas morfogênicas na cultura de tecidos dependem de fatores extrínsecos à planta matriz, tais como o meio de cultura, o uso de fitohormônios e as condições ambientais (VASIL, 1987), assim como fatores intrínsecos ao material vegetal, a exemplo da juvenilidade ou maturidade dos propágulos, condição fisiológica, entre outros (HARTMANN, 2002). A fase de multiplicação visa estimular a produção do maior número possível de brotos, sendo muitas vezes necessário o uso de fitohormônios para esse fim (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os fitohormônios mais utilizados nessa etapa são as citocininas, que são substâncias derivadas da adenina (aminopurina) e apresentam papel fundamental na diferenciação e regeneração *in vitro*. As citocininas induzem a divisão celular, quebra da dominância apical, indução e proliferação de gemas axilares e diferenciação de gemas adventícias (PREECE, 1995). As mais utilizadas na cultura de tecidos são cinetina (KIN), benzilaminopurina (BAP), zeatina (ZEA) e isopenteniladenina (2-ip).

Em espécies florestais já existe relevante conhecimento sobre a produção de mudas por micropropagação, principalmente para o eucalipto, devido o rápido crescimento e o reconhecido interesse econômico. Pesquisas com espécies nativas têm sido escassas, como é o caso da grápia (*Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr.). Esta espécie possui madeira de alta qualidade e com grande potencial para uso comercial. Portanto, tecnologias de produção massal de mudas são necessárias visando a implantação de povoamentos homogêneos e que garantam alta qualidade da madeira. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi estudar concentrações de citocininas e de carvão ativado na multiplicação de segmentos nodais e na conservação *in vitro* de microcepas de grápia.

4.2 Materiais e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Núcleo de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas (MPVP), do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, no período de junho a novembro de 2012.

4.2.1 Efeito da posição de coleta e do BAP

Segmentos de grápia, com 0,8 a 1,2 cm de comprimento e uma gema axilar, foram excisados das porções basal, mediana e apical de plântulas estabelecidas *in vitro*, com 30 dias de cultivo. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo, aproximadamente, 10 mL de meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) suplementado com 0; 2,2; 4,4; 6,6 ou 8,8 μM de 6-benzilaminopurina (BAP). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8.

O experimento foi um fatorial 3 x 5 (posição de coleta e concentrações de BAP), no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de três segmentos. Aos 30 dias foram avaliados quanto à presença ou não de calo na base do explante, número de brotos, comprimento total de brotos (cm), número de folhas e, em caso de presença de raiz, porcentagem de enraizamento, número e comprimento total das raízes (cm).

4.2.2 Efeito do BAP e do carvão ativado

Segmentos nodais de grápia, com 0,8 a 1,2 cm de comprimento e uma gema axilar, foram excisados de plântulas assépticas com 15 dias de cultivo *in vitro*. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo, aproximadamente, 10 mL de meio de cultura WPM suplementado com 0; 2,2; 4,4; 6,6 ou 8,8 μM de 6-benzilaminopurina (BAP) e acrescido ou não de carvão ativado ($1,5 \text{ g L}^{-1}$). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8.

O experimento foi um fatorial 2 x 5 (presença ou não de carvão ativado e concentrações de BAP), no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de quatro segmentos. Aos 30 dias os explantes foram avaliados quanto à presença ou não de calo na base do explante, ao número e comprimento total de brotos (cm), ao número de folhas e, em caso de presença de raiz, a porcentagem de enraizamento, o número e comprimento total das raízes (cm).

4.2.3 Efeito da KIN e do carvão ativado

Segmentos nodais de grápia, com 0,8 a 1,2 cm de comprimento e uma gema axilar, foram excisados de plântulas assépticas com 15 dias de cultivo *in vitro*. Os cultivos foram realizados em tubos de ensaio contendo, aproximadamente, 10 mL de meio de cultura WPM suplementado com 0; 2,3; 4,6; 6,9 ou 9,2 μM de cinetina (KIN) e acrescido ou não de carvão ativado ($1,5 \text{ g L}^{-1}$). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8.

O experimento foi um fatorial 2 x 5 (carvão ativado e concentrações de KIN), no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de quatro segmentos. Aos 30 dias os explantes foram avaliados quanto à presença ou não de calo na base do explante, ao número e comprimento total de brotos (cm), ao número de folhas e, em caso de presença de raiz, a porcentagem de enraizamento e o número e comprimento total das raízes (cm).

4.2.4 Conservação *in vitro* de microcepas

Plântulas assépticas de grápia com 15 dias de cultivo foram submetidas à poda da parte aérea para formar microcepas com um nó para serem mantidas *in vitro* e fornecer novas brotações como explantes. Para a conservação das microcepas *in vitro* foram testadas as concentrações 0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 μM de 6-benzilaminopurina (BAP) e a presença ou não de carvão ativado ($1,5 \text{ g L}^{-1}$) no meio de cultivo WPM. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8.

O experimento foi um fatorial 2 x 5 (carvão ativado e concentrações de BAP), no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de quatro microcepas. Aos 30 dias as microcepas foram avaliadas quanto a sobrevivência, a porcentagem de brotação, o número e comprimento total dos brotos (cm) e o número de segmentos nodais e de folhas. Após a avaliação, as microcepas foram subcultivadas em meio de cultura WPM livre de citocinina e na presença de $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado, para a sua conservação. O pH do meio de cultura foi ajustado

para 5,8. As microcepas foram avaliadas aos 30 dias de subcultivo para as mesmas variáveis a fim de detectar algum efeito residual da citocinina.

4.2.5 Condições de cultivo

Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h, sob intensidade luminosa de $14,3 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes.

4.2.6 Análise estatística

Para atender aos pressupostos da normalidade, os dados de porcentagem foram transformados para arcoseno $\sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância. As médias dos tratamentos com diferenças significativas ($P < 0,05$) foram comparadas pelo teste de Tukey ou regressão polinomial, com o auxílio do programa ESTAT (Unesp - Jaboticabal).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Efeito da posição de coleta e do BAP

Não houve interação significativa entre a posição de coleta e as concentrações de BAP para todas as variáveis analisadas. O número e o comprimento dos brotos foram influenciados pela posição de coleta, sendo observadas melhores respostas em segmentos basais, que diferiram significativamente dos demais explantes (Tabela 7). Segundo Nicoloso e Erig (2002), o fato de os segmentos basais apresentarem melhor capacidade de regeneração

pode estar relacionado com a maior quantidade de biomassa e, com isso, maior teor de carboidratos presentes nesse tipo de propágulo. Segmentos nodais de mangabeira (*Hancornia speciosa* var. *speciosa* Gomes) retirados da porção mediana e basal de plântulas assépticas têm sido mais indicados para a organogênese, por fornecerem brotos com maior número de segmentos nodais (LÉDO et al., 2011; SÁ et al., 2012).

Tabela 7 – Número e comprimento de brotos de segmentos de grápia (*Apuleia leiocarpa*) excisados de diferentes porções da plântula, mantidos em meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980), independente das concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

Posição de coleta	Número de brotos	Comprimento dos brotos (cm)
Basal	1,9 A*	1,4 A
Mediana	1,4 B	0,7 B
Apical	1,3 B	0,5 C
Média	1,5	0,8
CV (%)	14,6	15,8

* Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Para o comprimento dos brotos foi observado efeito das concentrações de BAP, sendo que o modelo cúbico foi o que melhor se ajustou para explicar o seu comportamento (Figura 1), com maiores respostas em explantes não tratados com BAP, independente da posição de coleta. O comprimento dos brotos apresentou tendência decrescente em relação ao aumento das concentrações de BAP. Este resultado pode estar relacionado com a quebra da dominância apical das gemas axilares com a citocinina, acarretando na inibição do crescimento dos brotos na medida em que se aumentaram as doses da mesma. Resultado semelhante foi obtido para amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), no qual foi observado menor comprimento dos brotos nos tratamentos com presença de BAP (ERIG et al., 2002). Além disso, citocininas em níveis elevados podem causar efeito fitotóxico, caracterizando-se, principalmente, pelo enrosetamento e falta de alongamento dos brotos (LANE, 1979; LESHEM et al., 1988).

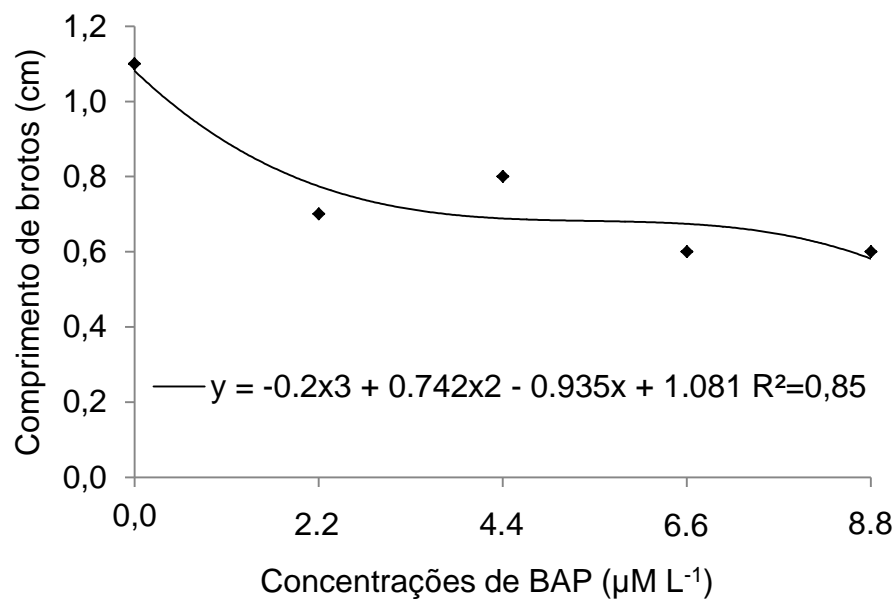


Figura 1 – Comprimento de brotos (cm) de segmentos de grápia (*Apuleia leiocarpa*) inoculados em meio nutritivo WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), independente da posição de coleta do explante. UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

Para o número de brotos não foi verificada a influência das concentrações de BAP, sendo observada média de 1,5 brotos por segmento para as diferentes posições de coleta. Em segmentos caulinares de amoreira-preta (*Rubus idaeus*) as concentrações de 2 e 4 μM de BAP resultaram no maior número de brotos (0,67 e 0,87) por explante (ERIG et al., 2002), sendo o mesmo verificado para o pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) quando utilizado 4,5 μM de BAP (ARAGÃO et al., 2011). No presente estudo, a citocinina não teve papel fundamental para a indução de brotos nos explantes de grápia, visto que houve satisfatória indução de brotos mesmo em meio nutritivo com ausência de BAP.

Para a porcentagem de calo, o número de folhas, a porcentagem de enraizamento e o número e comprimento de raízes não houve influência da posição de coleta e das concentrações de BAP. Foram observadas médias de 82,5% de formação de calo, 2,5 número de folhas, 1,6% de enraizamento, 0,4 número de raízes e 0,1 cm de comprimento das raízes. Os calos desenvolvidos nesses explantes apresentavam característica nodular, aspecto esponjoso e não friável com coloração branca, tornando-se marrom com o passar do tempo. A formação de calos se dá quando os níveis endógenos de auxina e citocinina presentes nos tecidos dos

explantes se igualam (SANTOS, 1998). Ao se considerar que neste estudo não foi utilizada auxina exógena em associação com a citocinina para a indução dos brotos, acredita-se que os explantes utilizados apresentavam quantidade de auxina endógena suficiente para o desenvolvimento de calos, assim como de raízes. Além disso, a formação de calos e raízes aparentemente não está diretamente relacionada com o genótipo, pois foi observado independente do tipo de explante e da aplicação de citocinina em segmentos oriundos de diferentes plantas. Vale salientar que, apesar da formação calogênica nos explantes não ser desejável na etapa de multiplicação, esta pode se constituir de um processo importante para a obtenção indireta de plantas, pois o calo pode conter células isoladas ou em grupo que possuem centros ativos de divisão celular, onde induzidos em condições adequadas se capacitam para produção de novos órgãos (JARDIM et al, 2010).

Considerando que o ponto de partida da micropropagação se baseia no desenvolvimento e crescimento de gemas axilares, associado ao menor custo de produção, o uso de segmentos nodais basais inoculados em meio WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) sem adição de BAP é adequado para a multiplicação *in vitro* de grápia, possibilitando satisfatória produção de brotos, os quais poderão ser utilizados na etapa de enraizamento. Cabe ressaltar que a posição do segmento afetou o número e o comprimento dos brotos, mas ainda apresentou resposta morfogênica. Assim, mesmo os segmentos apicais poderiam ser utilizados para a propagação de genótipos selecionados de grápia, apesar da menor taxa de multiplicação.

4.3.2 Efeito do BAP e do carvão ativado

Para o número de brotos e a porcentagem de calo houve interação significativa entre as concentrações de BAP e a presença ou não de carvão ativado no meio de cultura aos 30 dias de cultivo. O maior número de brotos por segmento nodal foi observado entre 4,4 e 8,8 μM de BAP e sem carvão ativado (2,3 a 2,6 brotos), que diferiram significativamente dos tratamentos contendo as mesmas concentrações de BAP e presença de carvão ativado (Tabela 8). Com o aumento das concentrações de BAP sem a adição de carvão ativado houve um incremento no número de brotos por segmento, de 1,1 no tratamento sem citocinina para 2,6 brotos

com 6,6 μM (Tabela 8). Este fato pode ser atribuído ao efeito do BAP na quebra da dominância apical, favorecendo a emissão de novos brotos (MOK, 1994). Para canela sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer), o uso de 5,0 μM de BAP e sem a presença de carvão ativado promoveu as maiores taxas de multiplicação, com média de 1,4 brotos por explante (MORTIZ et al., 2009). Na multiplicação *in vitro* de *Musa* sp., a adição de carvão ativado ao meio de cultura inibiu a formação de brotos nos explantes, independente das concentrações de BAP utilizadas, evidenciando o efeito de adsorção do BAP pelo carvão ativado, uma vez que na ausência deste, o aumento da concentração elevou a taxa de multiplicação (COSTA et al., 2006). Nesse caso, para que se obtenham os benefícios do carvão ativado e da citocinina adicionados aos meios, se faz necessário o aumento da concentração da mesma para compensar a adsorção (PULLMAN et al., 2005).

Foi observada a formação de calo em 100% dos segmentos nodais submetidos ao meio de cultura contendo BAP na ausência de carvão ativado. No entanto, no meio de cultura sem BAP e sem carvão ativado também houve a formação de calo em 55% dos explantes, a qual foi reduzida para 25% nos tratamentos com a presença de carvão ativado e sem BAP (Tabela 8). A formação de calos é uma resposta comum em tecidos cultivados *in vitro* (KERBAUY, 1998), o que pode explicar a sua presença em segmentos nodais de grábia. A formação calogênica ocorre, entre outros fatores, em decorrência da proliferação celular restrita às regiões seccionadas, epidérmicas e subepidérmicas dos explantes, com formação de tecido de cicatrização e zonas de intensa atividade meristemática (FLOH; HANDRO, 1985). Neste estudo, o uso do carvão ativado, mesmo na presença de BAP, reduziu a formação de calos em, aproximadamente, 66% (Tabela 8). Possivelmente esta resposta seja em decorrência da adsorção da citocinina pelo carvão ativado, o que diminuiu a formação de calos. Em explantes de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá), com o aumento da concentração de BAP no meio de cultura houve também aumento na incidência de calos endógenos, o que se deve provavelmente, ao desbalanceamento nos níveis endógenos de fitormônios nos explantes (CORDEIRO et al., 2004). Elevadas concentrações de citocinina parecem interagir com a quantidade de auxina endógena do explante, o que leva à formação de calos provocando certa inibição no surgimento dos brotos (SANTOS, 1998).

Neste estudo, também foi observado menor número de brotos nos tratamentos com o uso de carvão ativado, mas com parte aérea mais vigorosa se comparado aos demais tratamentos (Figura 2A). A presença de carvão ativado no cultivo *in vitro* de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.) também favoreceu o vigor dos brotos, com folíolos de coloração verde mais intensa (COELHO et al., 2001). A adição do carvão ativado promove a adsorção dos fenóis, melhorando o crescimento ou promovendo a organogênese (PAN; STADEN, 1998). Entretanto, durante esse processo, vitaminas, Fe-EDTA, íons Zn e Cu e demais substâncias e hormônios também são adsorvidos (JOHANNSON et al., 1990; VAN WINKLE et al., 2003), o que reduz a formação múltipla de brotações adventícias. Buchheim et al. (1989) e Pullman et al. (2005), afirmam que o uso de carvão ativado em meio de cultura é recomendado principalmente quando se busca o enraizamento *in vitro*. Os autores também afirmam que o carvão ativado promove o alongamento dos brotos, fato que contribui para a maximização do número de explantes obtidos por planta, assim como favorece a etapa de enraizamento. Já os brotos formados nos segmentos inoculados em meio de cultura sem carvão ativado apresentaram aspecto pouco vigoroso, com folhas menos desenvolvidas e de coloração amarelada (Figura 2B). Possivelmente, esse efeito seja em decorrência à presença de substâncias fenólicas liberadas pelo tecido vegetal, que quando presentes no meio de cultura inibem o desenvolvimento dos brotos (CID; TEIXEIRA, 2010).

Tabela 8 – Número de brotos e porcentagem de calo em segmentos nodais de grápia (*Apuleia leiocarpa*) inoculados em meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) na presença e ausência de carvão ativado e diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

Concentrações de BAP (μM)	Número de brotos		Porcentagem de calo	
	Com carvão	Sem carvão	Com carvão	Sem carvão
0,0	1,1 Aa*	1,1 Ba	25,0 Ab*	55 Ba
2,2	1,0 Ab	1,8 ABa	41,6 Ab	100 Aa
4,4	1,0 Ab	2,4 Aa	28,3 Ab	100 Aa
6,6	1,2 Ab	2,6 Aa	10,0 Ab	100 Aa
8,8	1,1 Ab	2,3 Aa	20,0 Ab	100 Aa
Média	1,1	2,0	24,9	91
CV (%)	10,2		26,9	

*Valores seguidos de letra diferente, maiúscula na vertical e minúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Para o número de folhas e a porcentagem de enraizamento não houve interação significativa entre as concentrações de BAP e a presença ou não de carvão ativado. Para ambas as variáveis, as melhores respostas ocorreram nos tratamentos contendo carvão ativado (Tabela 9). Similarmente, em porta-enxertos de prunus (*Prunus persica* (L.) Batsch. X *P. amygdalus* Batsch.), o maior número de folhas também foi observado em brotos de explantes cultivados em meio de cultura com adição de 8,4 mmol, que corresponde a 0,1 g L⁻¹ de carvão ativado (SOTIROPOULOS; FOTOPOULOS, 2005). Já em amoreira-preta cv. Ébano (*Morus nigra* L.) foi verificado um decréscimo no número de folhas na medida em que aumentaram as concentrações de carvão ativado ao meio de cultura até 4 g L⁻¹ (VILLA et al., 2007).

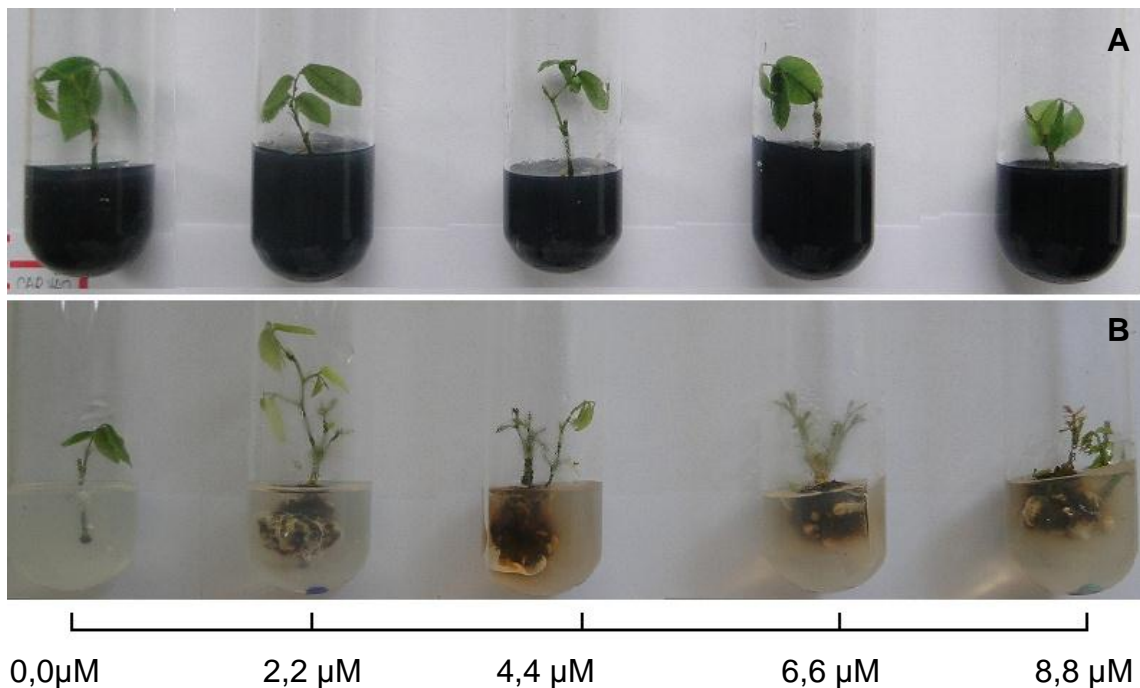


Figura 2 – Segmentos nodais de grápia (*Apuleia leiocarpa*) inoculados em meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado (A) e sem carvão ativado (B). UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

Para a porcentagem de enraizamento, o uso do carvão ativado favoreceu a formação de raízes em 8% dos explantes (Tabela 9). Concentrações de carvão ativado entre 1,0 e 2,0 g L⁻¹, em cultivos realizados sob luz branca, favoreceram o

enraizamento *in vitro* de orquídea (*Cattleya loddigesii* Lindley) (GALDIANO JÚNIOR et al., 2012). A adição de carvão ativado ao meio de cultura também foi benéfico para o crescimento da raiz principal de plântulas de mangabeira (*Hancornia speciosa*) (LÉDO et al., 2007).

Tabela 9 – Número de folhas e porcentagem de enraizamento em segmentos nodais de grápia (*Apuleia leiocarpa*) inoculados em meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) com e sem carvão ativado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

Tratamento	Números de folhas	Porcentagem de enraizamento
Com carvão	2,4 A*	8,0 A*
Sem carvão	1,7 B	1,0 B
Média	2,1	4,5
CV (%)	15,3	118,6

*Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A maior porcentagem de enraizamento no meio de cultura com a presença de carvão ativado pode ser atribuída à promoção de maior aeração e redução da luz incidente nas raízes (ARDITTI; ERNEST, 1993). O carvão ativado apresenta efeitos promotores de crescimento das plantas, fato que pode ser atribuído a sua função retentora de substâncias tóxicas presentes no meio de cultura, as quais são produzidas a partir da desidratação da sacarose durante a autoclavagem, de substâncias inibidoras presentes no ágar, ou ainda, pela redução da ação de metabólitos tóxicos que são eliminados pelo explante, tais como substâncias fenólicas, etileno e ácido abscísico (PAN; STADEN, 1998; THOMAS, 2008).

Neste estudo, o enraizamento de segmentos nodais de grápia foi favorecido com a presença do carvão ativado. Possivelmente, o carvão ativado adsorveu o excesso de citocinina presente no meio de cultura, o que favoreceu o balanço hormonal para a auxina, responsável pela indução da rizogênese. Além disso, os explantes utilizados na multiplicação foram coletados de plantas jovens, que apresentam elevado teor endógeno de auxinas (HARTMANN et al., 2002). Sobretudo, o enraizamento adventício pressupõe a existência da capacidade natural da espécie em desenvolver raízes e de células responsivas aos níveis exógenos de

fitohormônios, bem como sensíveis aos sinais de auxinas endógenas oriundas da parte aérea (MARKS et al., 2002). Também foi observado que, as raízes formadas nos segmentos nodais cultivados em meio de cultura com carvão ativado, no geral, apresentaram raízes secundárias (Figura 3A). Já as raízes formadas nos explantes inoculados em meio sem carvão não apresentaram raízes secundárias e, aparentemente, desenvolveram-se por organogênese indireta, ou seja, provenientes do calo (Figura 3B).

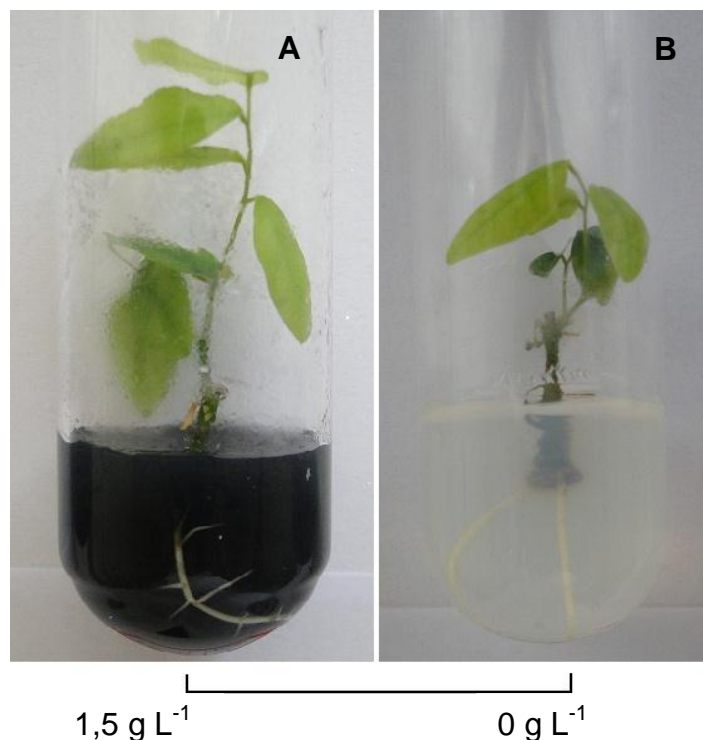


Figura 3 – Segmentos nodais de grápia (*Apuleia leiocarpa*) enraizados em meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) com $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado (A) e sem carvão ativado (B), independente das concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

O carvão ativado beneficiou a formação de raízes, no entanto, aparentemente, neutralizou a ação da citocinina na quebra de dominância apical e formação de múltiplos brotos. Possivelmente, o uso de concentrações mais elevadas de BAP na presença de carvão ativado favoreceria a formação de brotos, assim como a indução da rizogênese. Estudos para identificar a concentração de BAP que favoreça simultaneamente indução de brotos, principal objetivo da etapa de

mutiplicação, e a rizogênese deverão ser realizados, ao passo que, a indução do enraizamento de segmentos nodais concomitantemente a formação de brotos seria uma possível alternativa na micropropagação de grápia, eliminando a etapa de enraizamento *in vitro*.

4.3.3 Efeito do KIN e do carvão ativado

Para o comprimento de brotos e número de folhas não houve interação significativa entre as concentrações de KIN e a adição ou não de carvão ativado no meio de cultura aos 30 dias de cultivo. Para essas variáveis, houve influência apenas do carvão ativado, sendo que a sua adição aumentou o comprimento dos brotos e o número de folhas (Tabela 10). O crescimento dos brotos de *Pinus strobus* L. também foi favorecido com o acréscimo de carvão ativado ao meio de cultura (WEBB et al., 1978), sendo o mesmo verificado em explantes de bananeira (*Musa sp.*) (COSTA et al., 2006).

A adição de carvão ativado também influenciou a presença de calo, reduzindo de 74% para apenas 20% dos explantes (Tabela 10). Foi também observado que a formação de calo apresentou relação inversa com o crescimento da parte aérea e o número de folhas dos brotos, ou seja, explantes com maior comprimento de brotos e maior número de folhas apresentaram menor formação de calo. Possivelmente, este efeito seja em decorrência do balanço hormonal favorável para a citocinina, promovido pela presença do carvão ativado no meio de cultura com seu efeito adsorvente.

Tabela 10 – Comprimento dos brotos (CB), número de folhas (NF) e porcentagem de calo (%C) de segmentos nodais de grápia (*Apuleia leiocarpa*) mantidos em meio de cultura WPM (LLOYD e MC COWN, 1980) com e sem carvão ativado, independente das concentrações de cinetina (KIN). UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

Tratamento	CB	NF	%C
Com carvão	1,1 A*	2,5 A*	20,0 B*
Sem carvão	0,9 B	1,9 B	74,0 A
Média	1,0	2,2	47,0
CV (%)	10,4	12,6	48,7

*Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A concentração de KIN no meio de cultura afetou a porcentagem de calo (Figura 4). A maior porcentagem foi observada com a adição de 4,6 μM de KIN (70,8%), sem diferir significativamente dos tratamentos de 6,9 e 9,2 μM de KIN. A adição de KIN ao meio de cultura não afetou a porcentagem de enraizamento e nem a formação de brotos, sendo observada média de 7% de enraizamento e 1,2 brotos por segmento nodal. Portanto, a cinetina apresentou influência apenas para a formação de calo, sem relação com a formação de raízes nos explantes.

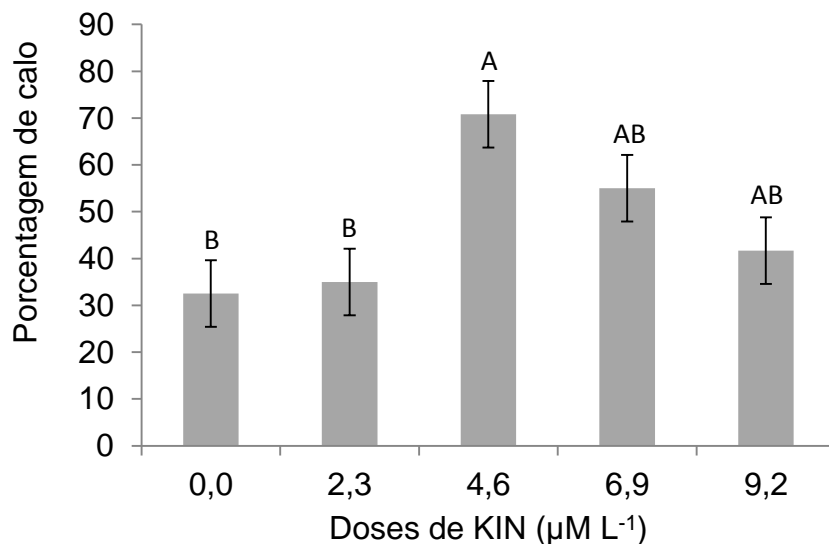


Figura 4 – Porcentagem de calo em segmentos nodais de grápia (*Apuleia leiocarpa*) mantidos em meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) em função das concentrações de cinetina (KIN), independente da presença ou não de carvão ativado. UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

4.3.4 Conservação *in vitro* das microcepas

Para o número de brotos e de folhas não houve interação significativa entre as concentrações de BAP e a presença ou não de carvão ativado aos 30 dias de cultivo. Para ambas as variáveis, houve influência significativa apenas do carvão ativado (Tabela 11). Com relação ao número de brotos, a ausência de carvão ativado no meio de cultura (Figura 5) maximizou o número de brotos (1,9) microcepa e diminuiu o número de folhas (Tabela 11). Diferentemente, em microcepas de louro-pardo (*Cordia trichotoma*), o meio de cultura suplementado com carvão ativado resultou em maior número de brotos e menor número de folhas (1,9 e 3,7, respectivamente) (HEBERLE, 2010). O BAP não influenciou as respostas de brotação nas microcepas de grábia, independente da presença ou não de carvão ativado no meio de cultura, sendo observada média de 95,3% de brotação das microcepas (Tabela 11).

Tabela 11 – Número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento de brotos (CB), número de segmentos nodais por broto (NSN) e porcentagem de brotação (%B), aos 30 dias, em microcepas de grábia (*Apuleia leiocarpa*) mantidas em meio de cultura WPM com e sem carvão ativado, independente das concentrações de BAP (μM). UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

	Tratamento	NB	NF	CB (cm)	NSN	%B
Carvão ativado (g L^{-1})	0	1,9 A*	2,2 B*	1,9 A	1,2 A	97 A
	1,5	1,7 B	3,3 A	2,3 A	1,3 A	93 A
BAP (μM)	0	1,6 A	2,9 A	1,9 A	1,1 A	90 A
	2,2	1,7 A	3,0 A	1,9 A	1,4 A	96,6 A
	4,4	1,9 A	3,3 A	2,4 A	1,1 A	100 A
	6,6	1,9 A	2,2 A	2,1 A	1,2 A	95 A
	8,8	2,0 A	2,3 A	2,1 A	1,5 A	95 A
	Média	1,8	2,7	2,1	1,2	95,3
CV (%)		8,3	20,1	14,5	15,6	15,0

* Valores seguidos de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.

Após 30 dias de subcultivo em meio de cultura livre de BAP e na presença de carvão ativado foi verificado um efeito residual dos tratamentos BAP realizados nas microcepas. Para o número de brotos, houve interação significativa entre as

concentrações de BAP e a presença ou não de carvão ativado (Tabela 12). O maior número de brotos (3,3 brotos por microcepa) foi obtido em microcepas mantidas em meio de cultivo contendo 8,8 μM de BAP e sem carvão ativado, diferindo significativamente do tratamento utilizando a mesma concentração de BAP na presença de carvão ativado (1,5 brotos por microcepa). Além disso, o efeito residual da citocinina usada na multiplicação pode ser uma das razões das dificuldades encontradas na fase de enraizamento (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

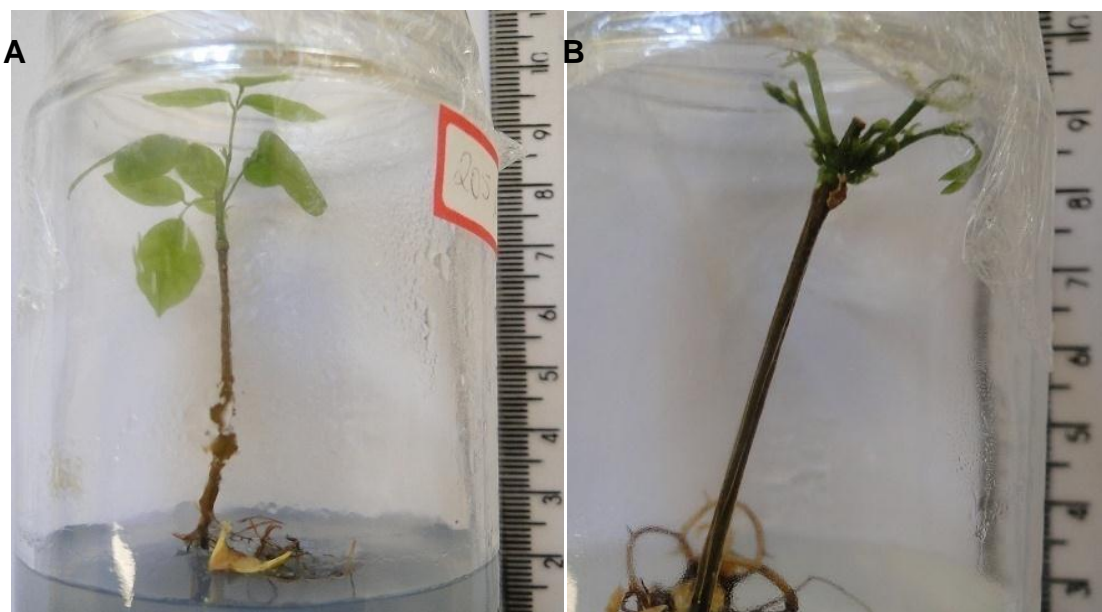


Figura 5 – Microcepas de origem seminal de grápia (*Apuleia leiocarpa*) mantidas em meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) com 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado (A) e sem carvão ativado (B), independentes das concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

Pode-se observar que não houve incremento no número de brotos com o aumento das concentrações de BAP nos meio de cultura na presença de carvão ativado. Entretanto, microcepas mantidas na ausência de carvão ativado mostraram incremento no número de brotos com o aumento da concentração de BAP (Tabela 12). Possivelmente, as microcepas mantidas em meio de cultura na presença de carvão ativado não conseguiram retirar deste a quantidade de citocinina suficiente para o desenvolvimento das brotações, visto que o antioxidante adsorve os

fitohormônios presentes no meio de cultura, reduzindo ou mesmo neutralizando sua atividade (COSTA et al., 2006).

Após avaliação das microcepas no subcultivo em meio livre de citocinina aos 30 dias foi possível identificar que as concentrações acima de 4,4 μM de BAP induziram maior número e tamanho dos brotos nas microcepas. Sendo assim, na fase de multiplicação de microcepas, recomenda-se o uso de 8,8 μM na ausência de carvão ativado durante 30 dias, com posterior subcultivo somente em meio de cultura WPM.

Os resultados deste trabalho indicam que microcepas de grápia não requerem a adição de citocinina, apesar de promover a quebra da dominância apical, o que maximiza o número de brotos. Este resultado é de certa forma esperado, visto que as raízes são os principais sítios de biossíntese desse fitorregulador de crescimento (VAN STADEN; SMITH, 1978). Tecidos meristemáticos e ápices caulinares também podem produzir citocinina, como evidenciado em algumas plantas que possuem sistema radicular pouco desenvolvido, a exemplo da bromélia (*Tillandsia recurvata* L.) (CHEN; PETSCHOW, 1978). Além disso, a citocinina produzida nas raízes tendem a ser acumular nos ápices, junto aos centros produtores de auxinas (LI et al., 1995), o que explicaria a superioridade de multiplicação de segmentos nodais mesmo sem a adição de citocinina aos meio de cultura.

Para porcentagem de sobrevivência e de brotação das microcepas, comprimento dos brotos, número de segmentos nodais e de folhas não foi verificado a influência das concentrações de BAP e a presença ou não de carvão ativado no meio de cultura. A porcentagem de sobrevivência das microcepas foi de 59,7% aos 30 dias de subcultivo em meio livre de citocinina. Considerando as microcepas vivas e não contaminadas, houve 100% de brotação, com comprimento médio dos brotos de 3,9 cm. Assim, a transferência das microcepas para meio livre de BAP após 30 dias em meio de cultura com citocinina foi essencial para a manutenção do vigor dos cultivos e para o crescimento dos brotos. Isto se deve, provavelmente, às características do meio de cultura WPM, resultando em menor duração de cada subcultivo.

Os resultados deste trabalho mostram que segmentos da posição basal da plântula são mais indicados para a multiplicação *in vitro* de grápia, quando comparados aos segmentos da posição apical e mediana, apresentando maior número e comprimento dos brotos. Para a multiplicação de segmentos nodais, o

BAP foi importante somente na ausência de carvão ativado. Com o aumento das doses de BAP incrementou o número de brotos, porém somente na ausência de carvão ativado. No entanto, o carvão ativado inibiu a formação de calos nos explantes, o que favoreceu o número de folhas e a porcentagem de enraizamento, além de resultar em brotos mais vigorosos. Segmentos nodais com a formação de brotos e raízes adventícias podem ser mantidos *in vitro*, na forma de microcepas fornecedoras de brotos para a etapa de enraizamento e também para a conservação dos clones no banco de germoplasma.

Tabela 12 – Número de brotos em microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) mantidas em meio de cultura WPM (LLOYD; MC COWN, 1980) na presença ou ausência de carvão ativado aos 30 dias de subcultivo. UFSM, Santa Maria, RS, 2012.

BAP (μM)	Carvão ativado	
	Com	Sem
0	1,8 Aa*	1,7 Ba
2,2	2,0 Aa	1,8 Ba
4,4	2,0 Aa	2,1 Aba
6,6	2,1 Aa	2,1 Aba
8,8	1,5 Ab	3,3 Aa
Média	1,9	2,2
CV (%)	16,3	

*Valores seguidos de letra diferente, maiúscula na vertical e minúscula na horizontal, diferem-se pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

As microcepas foram mantidas em diferentes concentrações de BAP e na presença ou não de carvão ativado. Nesse período, apenas o carvão ativado apresentou influência no desenvolvimento dos brotos, sendo observado em meios de cultura na presença do antioxidante maior número de folhas e, na sua ausência, maior número de brotos. Após subcultivo em meio de cultura sem citocinina e na presença de carvão ativado, houve influência das doses de BAP, comprovando o efeito residual da citocinina. As microcepas, mantidas inicialmente em meio sem carvão ativado, tiveram aumento do número de brotos com o aumento da concentração de BAP. A conservação de microcepas de grápia de origem seminal mostrou-se como uma alternativa importante para a conservação de germoplasma *in*

vitro e para o fornecimento de brotos para o enraizamento, assim como de segmentos nodais para a multiplicação. Estudos ligados à avaliação da capacidade de produção das microcepas e do número de subcultivos que fornece explantes aptos para a multiplicação são importantes, tanto para a conservação quanto para a propagação de clones de grápia. Microcepas oriundas da micropropagação também podem ser mantidas *in vitro* e serem fontes de novos explantes.

4.4 Conclusão

Segmentos nodais podem ser utilizados para a multiplicação *in vitro* de grápia em meio de cultura WPM com a adição de carvão ativado, o que facilita o enraizamento dos explantes e a formação de plantas completas.

A conservação de microcepas *in vitro* pode ser realizada em meio de cultura WPM com a adição de BAP, com posterior subcultivo para meio de cultura WPM com a adição de carvão ativado.

Referências Bibliográficas

ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I. do A. Efeito do BAP (6-Benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de pau-brasil. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 3, p. 339-345, jul./set. 2011.

ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: J. Wiley, 1993. 682p.

BISOGNIN, D. A. Breeding vegetatively propagated horticultural crops. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** (Online), v. 11, p. 35-43, 2011.

BONGA, J. M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J.M., DURZAN, D.J. **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985. p. 4-35.

BUCHHEIM, J. A., COLBURN, S. M., RANCH, J. P. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. **Plant Physiology**, v. 89, p. 768-775, 1989.

CHEN, C. M.; PETSCHOW, B. Cytokinin biosynthesis in cultured rootless tabaco plants. **Plant Physiology**, v. 62, p. 861-865, 1978.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. **Cultura *in vitro* de plantas**. Pedro Barreto Cid. editor técnico. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológica, p. 303, 2010.

COELHO, M. C. F. et al. Germinação de sementes de sucupira-branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.] *in vitro* e *ex vitro*. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v.25, n.1, p. 38-48, jan./fev., 2001.

CORDEIRO, I. M. C. C. et al. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá). **Cerne**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 118-124, 2004.

COSTA, F. H. S. et al. Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina a propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grande Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

ERIG, A. C.; ROSSI, A. D.; FORTES, G. R. de. L. 6-benzilaminopurina e Ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), CV. Tupy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 765-770, 2002.

FLOH, E. I. S.; HANDRO, W. Variation of histological patterns in tobacco callus during successive subcultures. **Canadian Journal of Botany**, Canada, v. 63, p. 1794-800, 1985.

GALDIANO JUNIOR, R. F. et al. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.5, p.801-807, mai, 2012.

GEORGE, E. F., SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. England: Eastern Press, 1984. 709p.

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

HARTMANN, H.T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 896p.

HEBERLE, M. **Propagação *in vitro* e *ex vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, p. 76. 2010.

JARDIM, L. S. et al. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Revista Acta Amazonica**. v. 40, n. 2, p. 275-280, 2010.

JOHANNSON, L.; CALLEBERG, E.; GEDIN, A. Correlations between activated carbon, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultured anthers of *Anemone canadensis*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.80, p.243-249, 1990.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. C.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v. 2, p. 519 – 531.

LANE, W. D. Regeneration of pear plants from shoot meristem-tips. **Plant Science Letters**, Limerick, v. 16, p. 337-342, 1979.

LÉDO, A. S. et al. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.4, p.989-993, 2007. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n4/07.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2012.

LÉDO, A. da S. et al. Establishment for *in vitro* propagation and conservation protocols of mangaba tree native of Brazil. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 918, p. 177-182, 2011.

LESHEN, B., WERKER, E., SHALEV, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, London, v.62, p.271-276, 1988.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Commercially Proceedings International Plant Propagator's Society**, Ashville, v. 30, p. 421-427. 1981.

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.

MARKS, T. R. et al. A role for polar auxin transport in rhizogenesis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 70, p. 189-198, 2002.

MOK, M. C. **Cytokinins**: chemistry, activity and function. MOK, D. W. S.; MOK, M. C. (Ed.) Boca Raton, FL: CRC, 1994, p. 155-166.

MORTIZ, A. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Ocotea odorifera*, *O. catharinensis* e *O. porosa*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n.59, p.37-44, jun/dez.2009.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, p. 1499-1506, 2002. Edição especial.

PAN, M. J.; STADEN, J. V. The use of charcoal *in vitro* cultura – A review, **Plant Growth Regulation**, The Hague, v. 26, p. 155-163, 1998.

PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação *in vitro*. In: A. BORÉM (ed). **Biotechnology Florestal**, Viçosa: UFV, p. 75-92, 2007.

PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator? **Plant tissue culture and biotechnology**, Rehovot , n. 1, v.1, p.26-37, 1995.

PULLMAN, G. S. et al. Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon. **Plant Cell Report**, New York, v. 24, p. 271-279, 2005.

SÁ, A. J. et al. Effect of sealing and explant types on the mangaba micropropagation. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.36, p.406-414, 2012.

SANTOS, M. R. A. **Germinação, calogênese e caracterização e saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach**. 1998. 81p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

SANTOS-SEREJO, J. A. et al. Biotecnologia: algo mais que plantas transgênicas. In: XVII Reunião Internacional ACORBAT, 2006, Joinville. Anais da XVII Reunião Internacional ACORBAT - Bananicultura: um negócio sustentável, 2006. v. 01. p. 10-23.

SOTIROPOULOS, T. E.; FOTOPOULOS, S. *In vitro* propagation of the PR204/84 peach rootstock (*Prunus persica* x *P.amygdalus*): the effect of BAP, GA (3), and activated charcoal on shoot elongation. **European Journal of Horticultural Science**, 2005, v. 70, p. 253-5.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, p.618-631, 2008. Disponível em: <http://pdn.sciencedirect.com/science?_main.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2012.

VAN STADEN, J.; SMITH, A. R. The synthesis of cytokinin in excised roots of maize and tomato under aseptic conditions. **Annals of Botany**, London v.42, p. 751-753, 1978.

VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Report**, New York, v.21, p. 1175-1182, 2003.

VASIL, V.; HILDEBRANDT, A. C. Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures. **Science**, Washington, v. 150, p. 889-892, 1965.

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.

WEBB, D. T. Flinn B. S.; Georgis, W. (1978). Micropropagation of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). **Canadian Journal of Forest Research**, v. 18, p. 1570-1580.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; DA SILVA, R. L. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 2009. 272 p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para o estabelecimento *in vitro* de plântulas assépticas de grápia, não é necessário o uso de hipoclorito de sódio para a desinfestação das sementes, sendo possível a obtenção de 95% de desinfestação e 82,8% de germinação com a aplicação de ácido sulfúrico para quebra de dormência tegumentar, associado à pré-asepsia com álcool 70%. Esse processo promove uma eficiente superação da dormência e possibilita satisfatória asepsia das sementes. As sementes podem ser inoculadas em meio WPM, MS ou ½ MS suplementado com 10 g L⁻¹ de sacarose e 4 g L⁻¹ de ágar e mantidas durante sete dias no escuro.

A multiplicação de grápia pode ser realizada a partir de segmentos nodais ou por microcepas de origem seminal. Quando realizada por meio de segmentos nodais, recomenda-se explantes da posição basal, mantidos em meio de cultura sem adição de citocina e acrescido de 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado. Já para a conservação de microcepas *in vitro*, a concentração de 8,8 µM de BAP, com posterior subcultivo para meio WPM suplementado com 1,5 g L⁻¹ de carvão ativado, promove a maior taxa de multiplicação de brotos que poderão ser utilizados na etapa de enraizamento.

Para a etapa de multiplicação ainda podem ser avaliados outros meios de cultura, já que o WPM é menos rico em nutrientes e íons quando comparado ao meio MS (GEORGE, 1996), e também a formação de microcepas a partir de segmentos nodais. Em termos de microcepas, também é importante avaliar a taxa de multiplicação em sucessivos subcultivos e também a competência dos explantes em formar novas brotações e raízes adventícias. Neste trabalho foram usados somente segmentos nodais obtidos de plântulas assépticas jovens, o que justificaria a utilização também de segmentos nodais oriundos de brotações adventícias. Também é possível que um meio de cultivo mais concentrado em nutrientes, associado a concentrações maiores de citocinina, poderá proporcionar um maior crescimento dos brotos, favorecendo a etapa de enraizamento, sem que se faça necessário o aumento de permanência do cultivo na etapa de multiplicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, D. M. I.; ALCALAY, N.; ANTONIO, M. G. Armazenamento de sementes de quatro espécies florestais do Rio Grande do Sul. *In*: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 6, Nova Prata, 1988. **Anais**. Nova Prata: Prefeitura Municipal de Nova Prata/Meridional, 1988. p.373-397.

ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência Agrotécnica**, Lavras: v. 24, n. 1, p.174-180, 2000.

ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I. do A. Efeito do BAP (6-Benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de pau-brasil. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 3, p. 339-345, jul./set. 2011.

BAI, Y.; ROMO, J. T. Seedling emergence of *Artemisia frigida* in relation to hydration-dehydration cycles and seedbed characteristics. **Journal of Arid Environments**. 30: 57-65, 1995.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BHATTACHARYA, J.; KHUSPE, S. S. *In vitro* and *in vivo* germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 91, n. 01-02, p. 39-49, 2001.

BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant tissue culture: theory and practice**, Amsterdam: Elsevier, p. 54-95, 1983.

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. Interpretação de resultados de germinação. *In*: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 209-22.

BRUNETTE, J. M. F. C. et al. Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido α -naftalenoacético. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 71, p. 19-24, ago. 2006.

CALDAS, L. S., HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1998. p. 87-132.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. v. 1, 1039 p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. Fundação Cargil, Campinas, 1983. 430 p.

CELULOSA ARGENTINA (Buenos Aires, Argentina). **Libro del árbol**. 3.ed. Buenos Aires, 1975. v. 2.

CID. L. P. B.; TEIXEIRA. J. B. **Cultura *in vitro* de plantas**. Pedro Barreto Cid. editor técnico. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológica, p. 303, 2010.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. **A Micropropagação de Eucalipto**. Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo, n. 58, p. 49-59, jan/jun. 2009.

EIBL, B. I. et al. Ensayos de germinación y análisis cuantitativo en semillas de especies forestales nativas de Misiones, R. A. **Yvyrareta**, Eldorado, v. 5, n. 5, p. 33-48, 1994.

ELDRIDGE, K. et al. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1994. p. 228-246.

FELIPPI, M. **Morfologia e silvicultura de espécies arbóreas da floresta estacional decidual**. 2010. 211 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 2000. 570p.

FICK, T. A. et al. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plântulas de louro-pardo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 4, p. 343-349, out-dez, 2007.

FLOSS, E. L. **Fisiologia das Plantas Cultivadas: o estudo que está por trás do que se vê**. Passo Fundo: UPF, 2004. 536 p.

GEORGE, F. E. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics Limited: England, 2nd Edition, v.2, 1996.

GOMES, A. L. **Propagação clonal**: princípios e particularidades. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1987. 69 p. (Série Didáctica, Ciências Aplicadas, 1).

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

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia**. Florianópolis: Steinmacher, 2006. 41 p.

HACKETT, W. P. Donor plant maturation and adventitious root formation. In: DAVIES, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1987a. p. 11 - 28. (Advances in Plant Sciences Series, 2).

HARTMANN, H. T. et al. **Plant Propagation**: principles and practices. 7.ed. New York: Englewood Clippis, 2002. 880p.

HERINGER, E. P.; FERREIRA, M. B. Árvores úteis da região geoeconômica do Distrito Federal: dendrologia: o gênero *Apuleia* - garapa. **Cerrado**, Brasília, n. 19, p. 20-24, 1973.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip, and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; et al. **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan Publishing Co., 1983. p. 177-227.

KANEKO, K; MOROHASHI, Y. Effect of sodium hypochlorite treatment on the development of α -amylase activity in mung bean cotyledons. **Plant Science**, Limerick, v. 164, p. 287-292, 2003.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan S. A., 2008. 431 p.

KLEIN, R. M. Contribuição à identificação de árvores nativas nas florestas do sul do Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 1982, Campos do Jordão. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal, 1982. p. 421-440. Publicado na Silvicultura em São Paulo, v. 16 A, parte 1, 1982.

KLEIN, R. M. **Meliáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1984. 138p.

LLOYD, G., McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v. 30, p. 421-327, 1980.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4.ed., v.1, Nova Odessa: Plantarum, 2002. 368p.

LORZA, R. F.; SOUZA, F. M. de; NAKASHIMA, R. Pomares de Sementes de Espécies Nativas: situação Atual e Propostas. In: **Pomares de Sementes de Espécies Florestais Nativas**. HIGA, A. R.; SILVA, L. D. Curitiba: FUPEF, 2006. 266p.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MAIXNER, A. E.; FERREIRA, L. A. B. Contribuição ao estudo das essências florestais e frutíferas nativas no Estado do Rio Grande do Sul. **Trigo e Soja**, Porto Alegre, n. 18, p. 3-20, 1976.

MANTOVANI, N. C., FRANCO, E. T. H. Respostas morfogênicas de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne et Planch em cultivo *in vitro*. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 46., 1995a, Ribeirão Preto. **Anais ...** Ribeirão Preto, 1995. p. 275.

MARTINS-CORDER, M. P.; BORGES JUNIOR, N. Desinfestação e quebra de dormência de sementes de *Acacia mearnsii* de Wild. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.

MATEO-SAGASTA, L. A. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, p. 89-94, 1990.

MATTOS, N. F.; GUARANHA, J. **Contribuição ao estudo da grápia**. Porto Alegre: Instituto de Pesquisa de Recursos Naturais Renováveis "AP", 1983. 27p. (Publicação IPRNR, 12).

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 4.ed. Great Britain: Pergamon Press, 1989. 270p.

MELO, J. T. et al. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado: ambiente e flora**. EMBRAPA, CPAC. Planaltina, DF, 1998. p. 195-243.

MIYOSHI, K.; MII, M. Stimulatory effects of sodium and calcium hypochlorite, pre-chilling and cytokinins on the germination of *Cypripedium macranthos* seed *in vitro*. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 102, p. 481-486, 1998.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 2.1, p. 2.24.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. dos S. Micropropagação de Copaíba. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 109-120. 2004.

PAN, M. J.; STADEN, J. V. The use of charcoal in vitro cultura – A review, **Plant Growth Regulation**, The Hague, v. 26, p. 155-163, 1998.

PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação *in vitro*. In: A. BORÉM (ed). **Biotecnologia Florestal**, Viçosa: UFV, p. 75-92, 2007.

PEREIRA, J. A.; MAINIERI, C. Madeiras do Brasil. **Anuário Brasileiro de Economia Florestal**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 9, p. 339-498, 1957.

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. Citocininas. In: KERBAUY, G. B. (Org.). **Fisiologia Vegetal**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – RJ, p. 250-278, 2004.

PIO, R. et al. 2001. Características anatômicas de porta-enxertos de citros para microenxertia em diferentes alturas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 4, p. 848-852.

PRAKASH, O. et al. Grafting micropropagated tea (*Camelia sinensis* (L.) O. Kuntze) Shoots on tea seedling – a new approach to tea propagation. 1999. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 10, p. 883-888.

QUEIROGA, V. de P.; et al. Efeito do condicionamento hídrico e mátrico sobre a qualidade de sementes de algodão deslindadas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 107-115, 2009.

REITZ, R., KLEIN, M., REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Companhia Rio-Grandense de Artes Gráficas, 1988. 525 p.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**: manual de dendrologia brasileira. São Paulo: Blücher, 1971. 294 p.

RODRIGUES, L. R. et al. Ensaio com o cultivo *in vitro* de explantes nodais de canela-sebo (*Persea venosa* Nees & Martius ex Nees). *Iheringia*, n. 50, p. 99-112, 1998.

SAADAT, Y. A.; HENNERTY, M. J. Factors affecting the multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 95, p. 251-260, 2002.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. **Análise da germinação**: um enfoque estatístico. Brasília: Editora da Universidade de Brasília, 2004. 248 p.

SATO, A. Y. et al. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da oxidação e contaminação. **Cerne**, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

SEMA. **Árvore nativa**: Biodiversidade também se planta. 2006. Disponível em: <<http://www.sema.rs.gov.br/sema/jsp/descnoticias.jsp?ITEM=1270&TIPO=1>> Acesso em: 21 de out. 2012.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia: princípios e aplicações. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba, RS: Agropecuária, 2001. p. 25 – 74.

SILVA, J. B. C.; NAKAGAWA, J. 1995. Estudos de fórmulas para cálculo de germinação. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 5, n. 1, p. 62-73.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symposium of the Society of Experimental Biology, v. 11, p. 118-130, 1957.

SOUZA, L. A. G. de.; VARELA, V. P.; BATALHA, L. F. P. Tratamentos pré-germinativos em sementes florestais da Amazônia: VI – Muirajuba (*Apuleia leiocarpa* (Vog.) Macb. var. *molaris* SPR. ex BENTH. (LEGUMINOSAE). **Acta Amazônica**, v. 24, n. 1/2, p. 81-90. 1994.

SRISKANDARAJAH, S., MULLINS, M. G., NAIR, Y. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult to propagate cultivars of apple. **Plant Science Letters**, Limerick, v. 24, p. 1-9, 1982.

TABARELLI, M. Flora arbórea da floresta estacional baixo-montana no Município de Santa Maria-RS, Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., 1992, São Paulo. **Anais**. São Paulo: Instituto Florestal, 1992. p.260-268. Publicado na Revista do Instituto Florestal, v. 4, parte 1, edição especial, 1992.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 565 p.

THORPE, T. A., HARRY, I. S., KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311-336.

THORPE, T. A.; KUMAR, P. P. Cellular control of morphogenesis. In: AHUJA, M. R. (Ed.) **Micropropagation of woody plants**. Netherlands: Kluwer Academic, 1993. p. 11-29.

TONON, G.; CAPUANA, M.; DIMARCO, A. Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by *in vitro* shoot organogenesis. **Scientia Horticulturae**, v. 87, p. 291-301, 2001.

TRIGIANO, R. N.; GENEVE, R. L.; MERKLE, S. A.; PREECE, J. E. Tissue and Cell Cultures os Woody Legumes. **Horticultural Reviews**, v. 14, p. 265-331, September. 1992.

VACCARO, S.; LONGHI, S. J.; BRENA, D. A. Aspectos da composição florística e categorias sucessionais do estrato arbóreo de três subseres de uma floresta estacional decidual, no Município de Santa Tereza - RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 1-18, 1999.

VASIL, V.; HILDEBRANDT, A. C. Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures. **Science**. Washington, v. 150, p. 889-892, 1965.

VÁSQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. **Annual Review of Ecology and Systematics**, n. 24, p. 69-87. 1993.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; DA SILVA, R. L. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa, 2009. 272 p.

ZHANG, L. et al. Factor sinfluencing shoots regeneration from cotyledons of tetraploid *Isatis indigotica* F. **In vitro-Plant**, New York, v. 39, p. 459-462, 2003.

ZHOU, Y. et al. Enzymes Associated with Blackhe art Development in Pineapple Fruit. **Food Chem**, n. 80, p. 565-572, 2003.

ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Applied forest tree improvement**. New York: North Carolina State University, 1984. 505p.

Apêndice A

Apêndice A1 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de desinfestação de sementes de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função das concentrações de hipoclorito (0, 2,5 e 5% de cloro ativo) e dos tempos de imersão (5, 10 e 15 min.), avaliadas aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
CONCENTRAÇÕES	2	410.4730	205.2365	1.2742 NS
TEMPOS DE IMERSÃO	2	175.1486	87.5743	0.5437 NS
CONCENTRAÇÕES X TEMPO	4	291.7341	72.9335	0.4528 NS
TRATAMENTO	8	877.3557	109.6695	
RESÍDUOS	81	13046.4561	161.0674	

Apêndice A2 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de germinação de sementes de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função das concentrações de hipoclorito (0, 2,5 e 5% de cloro ativo) e dos tempos de imersão (5, 10 e 15 min.), avaliadas aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
CONCENTRAÇÕES	2	920.7888	460.3944	0.6306 NS
TEMPOS DE IMERSÃO	2	2016.9916	1008.4958	1.3814 NS
CONCENTRAÇÕES X TEMPO	4	3740.7861	935.1965	1.2810 NS
TRATAMENTO	8	6678.5665	834.8208	
RESÍDUOS	81	59134.2096	730.0520	

Apêndice A3 - Resumo da análise de variância para a altura de plântulas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função dos tipos de meio de cultura (WPM, MS e ½ MS), avaliadas aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
MEIO DE CULTURA	2	0.0757	0.0379	0.70 NS
RESÍDUO	117	6.3219	0.0540	
TOTAL	119	6.3977		

Apêndice A4 - Resumo da análise de variância para o número de folhas de plântulas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função dos tipos de meio de cultura (WPM, MS e ½ MS), avaliadas aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
MEIO DE CULTURA	2	0.1811	0.0905	0.62 NS
RESÍDUO	117	17.1565	0.1466	
RESÍDUOS	119	17.3375		

Apêndice A5 - Resumo da análise de variância para o número de segmentos nodais de plântulas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função dos tipos de meio de cultura (WPM, MS e ½ MS), avaliadas aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
MEIO DE CULTURA	2	0.0601	0.0301	0.69 NS
RESÍDUO	117	5.1196	0.0438	
RESÍDUOS	119	5.1797		

Apêndice A6 - Resumo da análise de variância para o comprimento de raiz de plântulas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função dos tipos de meio de cultura (WPM, MS e ½ MS), avaliadas aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
MEIO DE CULTURA	2	0.5507	0.2754	2.79 NS
RESÍDUO	117	11.5454	0.0987	
RESÍDUOS	119	12.0962		

Apêndice A7 - Resumo da análise de variância para a altura da plântula de plântulas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função da condição lumínica (luz e escuro), concentração de sacarose (10, 20 e 30 g L⁻¹) e de ágar (4, 5 e 6 g L⁻¹), avaliadas aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
LUZ	1	0.4204	1.4204	10.1636 **
SACAROSE	2	0.2300	0.1150	0.8230NS
AGÁR	2	0.1126	0.0563	0.4030 NS
LUZ X SACAROSE	2	0.4218	0.2109	1.5090 NS
LUZ X AGÁR	2	0.2026	0.1013	0.7250 NS
SACAROSE X AGÁR	4	0.4431	0.1108	0.7926 NS
LUZ X SACAROSE X AGÁR	4	0.4129	0.1032	0.7386 NS
TRATAMENTO	17	3.2434	0.1908	
RESÍDUOS	75	10.4812	0.1397	

Apêndice A8 - Resumo da análise de variância para número de segmentos nodais de plântulas de grávia (*Apuleia leiocarpa*) em função da condição lumínica (luz e escuro), concentração de sacarose (10, 20 e 30 g L⁻¹) e de ágar (4, 5 e 6 g L⁻¹), avaliadas aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
LUZ	1	0.0296	0.0296	0.4267 NS
SACAROSE	2	0.0011	0.0006	0.0082 NS
AGÁR	2	0.0746	0.0373	0.5377 NS
LUZ X SACAROSE	2	0.0170	0.0085	0.1226 NS
LUZ X AGÁR	2	0.2036	0.1018	1.4675 NS
SACAROSE X AGÁR	4	0.4213	0.1053	1.5178 NS
LUZ X SACAROSE X AGÁR	4	0.3452	0.0863	1.2439 NS
TRATAMENTO	17	1.0925	0.0643	
RESÍDUOS	75	5.2039	0.0694	

Apêndice A9 – Resumo da análise de variância para o número de brotos em segmentos de grávia (*Apuleia leiocarpa*) em função das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM) e da posição do segmento (basal, mediana e apical), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	0.3696	0.0924	2.1795 NS
POSIÇÃO DO SEGMENTO	2	1.9370	0.9685	22.8423 **
BAP X POSIÇÃO	8	0.4757	0.0595	1.4024 NS
TRATAMENTO	14	2.7823	0.1987	
RESÍDUOS	285	12.0839	0.0424	

Apêndice A10 – Resumo da análise de variância para o comprimento de brotos em segmentos de grávia (*Apuleia leiocarpa*) em função das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM) e da posição do segmento (basal, mediana e apical), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	1.1906	0.2976	9.9693 **
POSIÇÃO DO SEGMENTO	2	1.8988	0.9494	31.7994 **
BAP X POSIÇÃO	8	0.2138	0.0267	0.8950 NS
TRATAMENTO	14	3.3032		
RESÍDUOS	285	8.5091		

Apêndice A11 – Resumo da análise de variância para o número de brotos em segmentos de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	1.2446	1.2446	58.9529 **
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	0.4164	0.1041	4.9305 **
CARVÃO X BAP	4	0.3384	0.0846	4.0077 **
TRATAMENTO	9	1.9994	0.2222	
RESÍDUOS	40	0.8445	0.0211	

Apêndice A12 – Resumo da análise de variância para porcentagem de calo em segmentos nodais de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	38102.8640	38102.8640	181.0918 **
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	3818.9365	954.7341	4.5376 **
CARVÃO X BAP	4	4555.7798	1138.9450	5.4131 **
TRATAMENTO	9	46477.5803	5164.1756	
RESÍDUOS	40	8416.2527	210.4063	

Apêndice A13 – Resumo da análise de variância para o número de folhas em segmentos nodais de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	0.6524	0.6524	11.0029 **
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	0.1682	0.0420	0.7090 NS
CARVÃO X BAP	4	0.2303	0.0576	0.9708 NS
TRATAMENTO	9	1.0509	0.1168	
RESÍDUOS	40	2.3719	0.0593	

Apêndice A14 – Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento em segmentos nodais de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	595.8590	595.8590	5.7829 *
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	467.8054	116.9514	1.1350 NS
CARVÃO X BAP	4	333.5553	83.3888	0.8093 NS
TRATAMENTO	9	1397.2197	155.2466	
RESÍDUOS	40	4121.5300	103.0383	

Apêndice A15 – Resumo da análise de variância para o comprimento de brotos em segmentos nodais de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de cinetina (0; 2,3; 4,6; 6,9; 9,2 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	0.0813	0.0813	5.0900 *
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	0.0488	0.0122	0.7633 NS
CARVÃO X BAP	4	0.0367	0.0092	0.5740 NS
TRATAMENTO	9	0.1667	0.0185	
RESÍDUOS	40	0.6388	0.0160	

Apêndice A16 – Resumo da análise de variância para o número de folhas em brotos de segmentos nodais de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de cinetina (0; 2,3; 4,6; 6,9; 9,2 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	0.4765	0.4765	11.3433 **
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	0.1933	0.0483	1.1506 NS
CARVÃO X BAP	4	0.1387	0.0347	0.8254 NS
TRATAMENTO	9	0.8085	0.0898	
RESÍDUOS	40	1.6802	0.0420	

Apêndice A17 – Resumo da análise de variância para porcentagem de calo em segmentos nodais de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de cinetina (0; 2,3; 4,6; 6,9; 9,2 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	24195.9588	24195.958	55.2168 **
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	6674.0013	1668.5003	3.8076 *
CARVÃO X BAP	4	1392.5144	348.1286	0.7945 NS
TRATAMENTO	9	32262.4745	3584.7194	
RESÍDUOS	40	17527.9554	438.1989	

Apêndice A18 – Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento em segmentos nodais de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de cinetina (0; 2,3; 4,6; 6,9; 9,2 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	9.3875	9.3875	0.0444 NS
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	165.3327	41.3332	0.1955 NS
CARVÃO X BAP	4	1280.5736	320.1434	1.5142 NS
TRATAMENTO	9	1455.2938	161.6993	
RESÍDUOS	40	8457.1248	211.4281	

Apêndice A19 – Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	82.5962	82.5962	0.5623 NS
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	398.0141	99.5035	0.6775 NS
CARVÃO X BAP	4	521.5617	130.3904	0.8877 NS
TRATAMENTO	9	1002.1721	111.3525	
RESÍDUOS	81	5875.1250	146.8781	

Apêndice A20 – Resumo da análise de variância para porcentagem de brotação em microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função da concentração de carvão ativado (0 ou 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	125.7985	125.7985	0.7638 NS
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	554.4009	138.6002	0.8415 NS
CARVÃO X BAP	4	589.6604	147.4151	0.8950 NS
TRATAMENTO	9	1269.8598	141.0955	
RESÍDUOS	81	6588.2039	164.7051	

Apêndice A21 – Resumo da análise de variância para o número de brotos em microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	0.0869	0.0869	5.4284 *
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	0.1072	0.0268	1.6745 NS
CARVÃO X BAP	4	0.0547	0.0137	0.8547 NS
TRATAMENTO	9	0.2489	0.0277	
RESÍDUOS	81	0.6404	0.0160	

Apêndice A22 – Resumo da análise de variância para o comprimento dos brotos em microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	0.1236	0.1236	2.2954 NS
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	0.1556	0.0389	0.7226 NS
CARVÃO X BAP	4	0.1043	0.0261	0.4845 NS
TRATAMENTO	9	0.3835	0.0426	
RESÍDUOS	81	2.1532	0.0538	

Apêndice A23 – Resumo da análise de variância para o número de segmentos nodais em brotos de microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	0.0013	0.0013	0.0307 NS
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	0.0993	0.0248	0.6037 NS
CARVÃO X BAP	4	0.0669	0.0167	0.4067 NS
TRATAMENTO	9	0.1674	0.0186	
RESÍDUOS	81	1.6442	0.0411	

Apêndice A24 – Resumo da análise de variância para o número de folhas em brotos de microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	1.0992	1.0992	8.7281 **
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	0.7146	0.1787	1.4186 NS
CARVÃO X BAP	4	0.8611	0.2153	1.7093 NS
TRATAMENTO	9	2.6749	0.2972	
RESÍDUOS	81	5.0375	0.1259	

Apêndice A25 – Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) após subcultivo em meio livre, em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	66.2813	66.2813	0.4124 NS
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	646.9051	161.7263	1.0063 NS
CARVÃO X BAP	4	901.4251	225.3563	1.4023 NS
TRATAMENTO	9	1614.6114	179.4013	
RESÍDUOS	81	13017.3976	160.7086	

Apêndice A26 – Resumo da análise de variância para porcentagem de brotação de microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) após subcultivo em meio livre, em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	66.2813	66.2813	0.4124 NS
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	646.9051	161.7263	1.0063 NS
CARVÃO X BAP	4	901.4251	225.3563	1.4023 NS
TRATAMENTO	9	1614.6114	179.4013	
RESÍDUOS	81	13017.3976	160.7086	

Apêndice A27 – Resumo da análise de variância para número de brotos em microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) após subcultivo em meio livre, em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	0.1329	0.1329	2.0051 NS
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	0.2099	0.0525	0.7919 NS
CARVÃO X BAP	4	1.0699	0.2675	4.0362 **
TRATAMENTO	9	1.4126	0.1570	
RESÍDUOS	81	5.3676	0.0663	

Apêndice A28 – Resumo da análise de variância para comprimento dos brotos em microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) após subcultivo em meio livre, em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	0.1047	0.1047	0.6266 NS
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	0.0600	0.0150	0.0898 NS
CARVÃO X BAP	4	1.0256	0.2564	1.5345 NS
TRATAMENTO	9	1.1903	0.1323	
RESÍDUOS	81	13.5340	0.1671	

Apêndice A29 – Resumo da análise de variância para número de segmentos nodais em brotos de microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) após subcultivo em meio livre, em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	0.0044	0.0044	0.319 NS
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	0.0838	0.0209	0.1512 NS
CARVÃO X BAP	4	0.6914	0.1728	1.2479 NS
TRATAMENTO	9	0.7796	0.0866	
RESÍDUOS	81	11.2194	0.1385	

Apêndice A30 – Resumo da análise de variância para número de folhas em brotos de microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) após subcultivo em meio livre, em função da concentração de carvão ativado (0 e 1,5 g L⁻¹) e das concentrações de benzilaminopurina (0; 2,2; 4,4; 6,6 e 8,8 µM), avaliada aos 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G.L .	S.Q.	Q.M.	F
CARVÃO ATIVADO	1	0.1348	0.1348	0.2924 NS
CONCENTRAÇÕES DE BAP	4	1.9652	0.4913	1.0656 NS
CARVÃO X BAP	4	1.5865	0.3966	0.8602 NS
TRATAMENTO	9	3.6865	0.4096	
RESÍDUOS	81	37.3455	0.4611	