

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

**INTRODUÇÃO AO CULTIVO *IN VITRO* DE AÇOITA-
CAVALO (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Andressa Vasconcelos Flôres

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

INTRODUÇÃO AO CULTIVO *IN VITRO* DE AÇOITA- CAVALO (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini)

por

Andressa Vasconcelos Flôres

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

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

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

© 2007

Todos os direitos autorais reservados a Andressa Vasconcelos Flôres. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser com autorização por escrito do autor.

Endereço: Rua Marques do Herval, n. 399, Centro Sul, Santo Ângelo, RS, 98801-630.

Fone: (055)8122-5080; End. Eletr.: andressafloressm@yahoo.com.br

**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

**INTRODUÇÃO AO CULTIVO *IN VITRO* DE AÇOITA-CAVALO
(*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini)**

elaborada por
Andressa Vasconcelos Flôres

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Lia Rejane Silveira Reiniger, Prof^a. Dr^a. - UFSM
(Presidente/Orientadora)

Fabio Luiz Fleig Saidelles, Dr. - (Fepagro/Florestas)

Marlove Fátima Brião Muniz, Prof^a. Dr^a. - UFSM

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2007.

**“O mundo vai girando cada vez mais veloz
A gente espera do mundo
O mundo espera de nós
Um pouco mais de paciência...”**

**Lenini
(Paciência)**

Aos meus pais Paulo Cesar Flôres e Abigail Vasconcelos Flôres, ao meu irmão Paulo Cesar Flôres Júnior, e aos meus verdadeiros amigos.

Dedico...

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal por oferecerem a estrutura e os recursos necessários para o desenvolvimento de meu mestrado.

Aos professores pelo ensinamento, dedicação e profissionalismo.

A minha Orientadora Dr^a. Professora Lia Rejane Silveira Reiniger pelo apoio, orientação, ensinamentos, atenção, carinho e amor. Saiba que para mim, sua presença foi fundamental na minha formação profissional e também pessoal, obrigada pela amizade.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da UFSM, em Santa Maria, RS, por oportunizar o desenvolvimento de meu mestrado.

A Capes pelo apoio financeiro ao desenvolvimento de meu trabalho.

A minha mãe Abigail pelo apoio, amor incondicional e, sobretudo pelo incentivo, sempre indispensável.

Ao meu pai pelo carinho, incentivo e paciência, mesmo a distância.

Ao meu irmão pelo carinho, companheirismo e apoio.

A minha “filha poodle Mariah” pelo companheirismo nas infinitas horas de leitura, amor incondicional e compreensão.

Aos colegas de laboratório, Aline C., Aline P., Cássia, Diego, Felipe Geórgia, Joana e Josiana, pela ajuda, amizade e lealdade.

A minha grande amiga “Candinha” que mesmo de longe me incentivou muito, com suas palavras de apoio e carinho.

A minha amigona “Brunilda” que esteve ao meu lado nos momentos mais inusitados, oferecendo ajuda a todo o tempo, obrigada.

A todos os amigos verdadeiros que contribuíram com sua amizade, dando apoio e força em todas as horas, Ana Catarina, Daiane, Felipe, Lorenzo, Veridiana e um agradecimento especial à secretária Cerlene (Tita) pela ajuda.

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para mais esta vitória em minha vida “a obtenção do título de mestre”.

RESUMO

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

INTRODUÇÃO AO CULTIVO *IN VITRO* DE AÇOITA-CAVALO (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini)

AUTORA: ANDRESSA VASCONCELOS FLÔRES
ORIENTADORA: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER
Santa Maria, 28 de fevereiro de 2007

Açoita-cavalo, *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini, pertencente à família Tiliaceae, é uma espécie florestal que sofreu grande ação antrópica nas últimas décadas, fato este que contribuiu muito para a redução das populações naturais, tornando necessária a conservação de germoplasma *in vitro*. Apresenta germinação lenta e irregular, variável entre 20% e 75%, e viabilidade das sementes muito desuniforme. Estas características contribuem para uma reduzida frequência da espécie em florestas naturais. Como forma de propagação vegetativa, a micropropagação torna-se uma alternativa para a regeneração de plantas que apresentam dificuldade de reprodução natural, além de se apresentar como uma maneira de conservação das espécies. O trabalho teve como objetivos estabelecer um protocolo de desinfestação para germinação asséptica de sementes de açoita-cavalo, determinar o tipo de explante e o meio de cultivo mais eficientes para o estabelecimento *in vitro*, verificar a influência da orientação do explante no frasco sobre o desenvolvimento *in vitro* e observar a influência de diferentes concentrações da citocinina BAP na multiplicação de segmentos nodais de açoita-cavalo. Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da UFSM, em Santa Maria, RS. As sementes foram coletadas e armazenadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro/Florestas em Santa Maria, RS, em 2004 e 2005, e as plântulas obtidas foram utilizadas como fonte de explantes para os estudos *in vitro*. Durante os experimentos de desinfestação observou-se que a imersão das sementes em água quente é fundamental para o controle (parcial) de microrganismos associados às sementes, bem como promover uma maior taxa de germinação. O cloreto de mercúrio controlou parcialmente a contaminação fúngica e totalmente a contaminação bacteriana, porém demonstrou toxicidade ao desenvolvimento das plântulas com o aparecimento de folhas amareladas. Para o estabelecimento *in vitro* de açoita-cavalo pode-se empregar tanto ápices caulinares como segmentos nodais, independente do meio de cultivo WPM ou MS. Para o enraizamento, o meio WPM foi mais eficiente, nos dois tipos de explantes, ápices caulinares e segmentos nodais. Visando maximizar o cultivo de açoita-cavalo, deve-se utilizar para o estabelecimento o meio WPM, por ter custo reduzido e explantes do tipo segmento nodal, que são produzidos em maior número por plântula. Não há influência da orientação do explante em relação ao frasco no desenvolvimento de culturas *in vitro* de açoita-cavalo. Nas concentrações testadas, a citocinina BAP inibiu a formação de brotações e folhas. As concentrações de BAP testadas foram altas e podem ter sido tóxicas ao desenvolvimento dos segmentos nodais de açoita-cavalo. Novos estudos devem ser realizados para uma averiguação mais aprofundada do cultivo *in vitro* de açoita-cavalo.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*; micropropagação; *Luehea divaricata*

ABSTRACT

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

THE AÇOITA-CAVALO INTRODUCTION CULTURE *IN VITRO* (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini)

AUTHOR: ANDRESSA VASCONCELOS FLÔRES

ADVISOR: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Date and Place of Defense: Santa Maria, February, 28th, 2007

“Açoita-cavalo”, *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini, pertaining to the Tiliaceae family, is a forest species that suffered great entropic action in the last decades, fact that contributed a lot to the reduction of the natural populations, becoming necessary the conservation of germ plasma *in vitro*. It presents slow and irregular, changeable germination between 20% and 75%, and viability of the seeds very unevenness. These characteristics contribute for one reduced frequency of the species in natural forests. As form of vegetative propagation, the micropropagation becomes an alternative for the regeneration of plants that present difficulty of natural reproduction, beyond presenting itself as a conservation way for the species. The work had as objective to establish a protocol of disinfestations for aseptic germination of “açoita-cavalo” seeds, to determine the more efficient type of explants and way of culture for the establishment *in vitro*, to verify the influence of the orientation of the explants in the bottle on the development *in vitro* and to observe the influence of different concentrations of cytokine BAP in the multiplication of nodes segments of “açoita-cavalo”. The works had been carried through in the Laboratory of Tissue Culture of the Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, in Santa Maria, RS. The seeds had been collected and conserved by Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária - Fepagro/Florestas in Santa Maria, RS, in 2004 and 2005, and seedlings gotten in had been used as source of explants for the studies *in vitro*. During the disinfestations experiments it was observed that the immersion of the seeds in hot water is basic for the control (partial) of microorganisms associated to the seeds, as well as promoting a bigger tax of germination. The mercury chloride controlled the fungal contamination partially and total the bacterial contamination, however it demonstrated toxicity to the development of seedling with the yellowish leaf appearance. For the establishment *in vitro* of “açoita-cavalo” can be used as many apices shoot as nodes segments, independent of the way of culture WPM or MS. For the rooting, the half WPM was more efficient, in the two types of node explants, apices shoot and segments. Aiming at to maximize the “açoita-cavalo” culture, the half WPM must be used for the establishment, for having reduced cost and explants of the type nodal segment, that are produced in bigger number for seedling. It does not have influence of the orientation of the explants in relation to the bottle in the development of cultures *in vitro* of “açoita-cavalo”. In the tested concentrations, cytokine BAP inhibited the formation of shoot and leaves. The tested concentrations of BAP had been high and can have been toxic to the development of the node segments of “açoita-cavalo”. New studies must more be carried through for an ascertainment deepened of the culture *in vitro* of “açoita-cavalo”.

Key words: culture *in vitro*; micropropagation; *Luehea divaricata*.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

TABELA 1 – Análise de variância para a variável formação de raiz em explantes de açoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Martius et Zuccarini). Santa Maria, RS, 2007.....	48
---	----

CAPÍTULO IV

TABELA 1 – Efeito de diferentes concentrações de BAP na porcentagem de sobrevivência, no estabelecimento e na presença de calos em segmentos nodais de açoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Martius et Zuccarini). Santa Maria, RS, 2007.....	58
---	----

TABELA 2 – Efeito de diferentes concentrações de BAP no número de folhas e brotações desenvolvidas em segmentos nodais de açoita-cavalo (<i>Luehea divaricata</i> Martius et Zuccarini). Santa Maria, RS, 2007.....	59
--	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- FIGURA 1 – Percentual de contaminação fúngica, contaminação bacteriana e germinação de sementes de *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini cultivadas *in vitro*. Santa Maria, RS, 2007.....38
- FIGURA 2 – Médias de contaminação fúngica, contaminação bacteriana e germinação de sementes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini) submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação, Santa Maria, RS, 2007.....40
- FIGURA 3 – Percentual de contaminação fúngica, contaminação bacteriana e germinação de sementes de *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini. cultivadas *in vitro*. Santa Maria, RS, 2007.....41
- FIGURA 4 – Médias de contaminação fúngica e bacteriana em sementes germinadas *in vitro* de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini). Santa Maria, RS, 2007.....43
- FIGURA 5 – Médias de germinação *in vitro* de sementes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini). Santa Maria, RS, 2007.....44
- FIGURA 6 – Aspecto de plântulas de açoita- cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini) germinadas *in vitro*, (a- plântulas não tratadas com cloreto de mercúrio; b e c- plântulas amareladas, tratadas com cloreto de mercúrio). Santa Maria, RS, 2007.....45

CAPÍTULO II

FIGURA 1 – Enraizamento de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini) em dois meios de cultivo, WPM e MS. Santa Maria, RS, 2007.....49

FIGURA 2 – Raízes em ápices caulinares de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini), cultivados em meio WPM (A) e MS (B). Santa Maria, RS, 2007.....50

FIGURA 3 – Desenvolvimento de diferentes explantes em diferentes meios de cultivo, aos 60 dias de cultivo. (a – ápice caulinar em meio WPM; b – segmento nodal em meio WPM; c – ápice caulinar em meio MS; d – segmento nodal em meio MS). Santa Maria, RS, 2007.....51

CAPÍTULO III

FIGURA 1 – Efeito da orientação dos explantes na formação de folhas e nós de *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini cultivados *in vitro*. Santa Maria, RS, 2007.....54

CAPÍTULO IV

FIGURA 1 – Número de nós em segmentos nodais (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini), cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações de BAP. Santa Maria, RS, 2007.....60

FIGURA 2 – Efeito da concentração de BAP no enraizamento de segmentos nodais de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini). Santa Maria, RS, 2007.....61

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Tabela dos sais presentes nos meios de cultura Wood Plant Médium – WPM (Lloyd e McCown,1981) e MS (Murashige e Skoog, 1962).....	64
--	----

LISTA DE APÊNDICE

APÊNDICE A – Teste de germinação de sementes de açoita-cavalo.....65

APÊNDICE B – Teste de sanidade em sementes de açoita-cavalo.....66

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ANEXOS.....	12
LISTA DE APÊNDICE.....	13
 1 INTRODUÇÃO.....	 16
 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	 18
2.1 Descrição da espécie – <i>Luehea dicaricata</i> Martius et Zuccarini	20
2.2 Cultura de tecidos	21
2.2.1 Micropropagação	22
2.2.2 Desinfestação superficial e germinação asséptica de sementes.....	25
2.2.3 Explante e meio de cultura.....	26
2.2.4 Orientação do explante e citocininas.....	27
 3 CAPÍTULO I - DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL E GERMINAÇÃO ASSÉPTICA DE SEMENTES DE AÇOITA-CAVALO	 30
3.1 Objetivo	30
3.2 Material e métodos	30
3.2.1 Experimento I	31
3.2.2 Experimento II	32
3.2.3 Experimento III	34
3.2.4 Experimento IV	35
3.3 Resultados e discussão	37
3.3.1 Resultados e discussão do experimento I.....	37
3.3.2 Resultados e discussão do experimento II.....	39
3.3.3 Resultados e discussão do experimento III.....	41
3.3.4 Resultados e discussão do experimento IV.....	42
3.4 Conclusão	45

4 CAPÍTULO II - SELEÇÃO DE MEIO E EXPLANTE DE <i>Luehea divaricata</i> Martius et Zuccarini PARA O ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i>	46
4.1 Objetivo	46
4.2 Material e métodos	46
4.3 Resultados e discussão	47
4.4 Conclusão... ..	51
 5 CAPÍTULO III - EFEITO DA ORIENTAÇÃO DO EXPLANTE EM RELAÇÃO AO MEIO DE CULTURA	52
5.1 Objetivo	52
5.2 Material e métodos	52
5.3 Resultados e discussão	53
5.4 Conclusão	55
 6 CAPÍTULO IV - INFLUÊNCIA DA CITOCININA 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) NA MULTIPLICAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE AÇOITA-CAVALO <i>IN VITRO</i>	56
6.1 Objetivo	56
6.2 Material e métodos	56
6.3 Resultados e discussão	57
6.4 Conclusão.....	61
 CONCLUSÕES GERAIS	62
 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

Luehea divaricata Martius et Zuccarini, popularmente conhecida, na região sul do Brasil, como açoita-cavalo, é uma espécie florestal com ampla distribuição geográfica, indicada para reflorestamentos. Apresenta madeira muito macia, empregada nas estruturas de móveis e na confecção de móveis vergados (curvados), peças torneadas, entre outros. Constitui planta pioneira de rápido crescimento, decídua, heliófita, característica das florestas aluviais (LORENZI, 2002), propriedades que tornam a espécie de alto valor silvicultural.

Esta espécie assim como tantas outras, tiveram suas populações naturais devastadas pela ação antrópica e, apesar de não estar na lista oficial de espécies em vias de extinção, a conservação genética do açoita-cavalo é de suma importância, garantindo assim a preservação dos genes, que serão a base para o melhoramento genético, através do uso da biotecnologia que vem evoluindo constantemente. A extinção de uma espécie significa a perda para sempre de combinações gênicas únicas e insubstituíveis, o que justifica a conservação genética.

Uma maneira de se preservar genes é através da conservação *in vitro*, que é realizada com o auxílio de uma ferramenta denominada cultura de tecidos. As plantas obtidas com esta técnica são denominadas clone e são geneticamente idênticas às plantas doadoras de material vegetal ou plantas-mãe. A cultura de tecidos em espécies lenhosas vem ganhando grande impulso nas últimas décadas, sua utilização já é rotineira em muitas empresas do ramo florestal, demonstrando ser uma tecnologia viável para a produção de mudas de alto padrão genético, fisiológico e sanitário.

As espécies conservadas *in vitro* normalmente são estabelecidas a partir da germinação de sementes, desenvolvimento de tecidos e cultura de gemas e embriões, sendo mantidas em condições assépticas, por tempo indeterminado sob condições de crescimento lento. Este tipo de conservação “*ex situ*” é uma técnica muito promissora para a conservação da diversidade genética e, ainda, possui diversas vantagens em relação à conservação no campo (*in situ*), tais como: menor risco de perda do germoplasma, maior qualidade fitossanitária, redução no custo de manutenção, rápida multiplicação e armazenamento, menor necessidade de espaço, disponibilidade imediata para propagação e facilidade de intercâmbio.

Desta forma, a conservação genética é uma garantia para o futuro, pois os genes preservados hoje por cultura de tecidos ou por outra técnica, representam uma oportunidade real para que, no futuro, as próximas gerações possam usufruir da gigantesca biodiversidade ainda existente em nosso planeta.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil vem utilizando seus recursos florestais, desde seu descobrimento, como um dos fatores de promoção de seu desenvolvimento. Todavia, mesmo após cinco séculos, ainda não reconhece integralmente o valor e a importância dos mesmos. Apesar de contar com uma legislação florestal e ambiental satisfatória, continua usando seus recursos florestais sem critérios técnicos apropriados e uma base sólida de informações, que permita definir onde, quando, como e em que quantidade estes recursos podem ser utilizados (BRENA, 1996).

A drástica redução das florestas tropicais elevou as taxas estimadas de extinção de espécies biológicas a cifras significativamente altas. Ainda que os números sejam imprecisos e, considerando-se os processos naturais de extinção, acredita-se que o homem tenha elevado estas taxas para algo em torno de 100 a 1000 vezes (MEDEIROS, 2003).

A conservação de recursos genéticos vegetais dos biomas tropicais é um tema de importância mundial. Enquanto muitas espécies estão em risco de extinção nas regiões temperadas, várias espécies desaparecem todos os dias nos trópicos. A proteção de espécies frente à iminente extinção é, portanto uma questão prioritária. A conservação e o manejo da biodiversidade, mesmo em áreas protegidas nos trópicos, constituem-se em desafios complexos que requerem conhecimentos básicos sobre a distribuição e a abundância de espécies, suas interações mutualistas, sua biologia reprodutiva e a estrutura genética de suas populações (PARK et al, 1998, apud BASSAN, 2006).

Ao lado da produção de madeira (produção de bens materiais), a floresta e a produção florestal produzem bens imateriais que são conceituados como

benefícios indiretos (*social benefits*), sendo estes: manutenção da fertilidade do solo; do regime de água; da limpeza do ar; e da recreação para os habitantes dos centros urbanos, etc. O conjunto de todos esses benefícios, ou seja, a produção de bens materiais e imateriais chama-se de "uso-múltiplo" da floresta (SELING e SPATHELF, 1999).

Apesar de atualmente as espécies florestais exóticas suprirem a demanda por produtos madeireiros, diversas árvores nativas, apresentam infinitas qualidades, podendo ser utilizadas em plantios homogêneos, bastando para isso, que ocorra aprimoramento do conhecimento silvicultural, principalmente relacionado ao melhoramento genético.

Um importante método para a multiplicação de plantas lenhosas é a propagação vegetativa. Este método oferece certas vantagens quando comparado à reprodução sexuada; assim, para árvores selecionadas, é muitas vezes indicado. Na reprodução sexuada consegue-se capturar apenas o componente genético aditivo da superioridade do genótipo selecionado, enquanto que, na propagação vegetativa, existe a possibilidade de capturar o componente genético total, resultando em maiores ganhos dentro de uma mesma geração. A segregação e a recombinação gênica, verificadas na reprodução sexuada, resultam em um alto grau de variabilidade, já por via vegetativa, redundam em uniformidades de crescimento, características tecnológicas e morfológicas (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

Durante os últimos anos, houve um expressivo acréscimo no uso da propagação vegetativa *in vitro* como ferramenta para a implantação de florestas clonais, substituindo-se as práticas convencionais por técnicas que passaram a garantir a superioridade genética dos indivíduos (BASSAN, 2006).

Entre os vários processos de cultura de tecidos, pode-se destacar a micropropagação, que possibilita a produção de mudas a partir de qualquer tecido da planta doadora, mantendo estáveis as características genotípicas de interesse, aumentando em grande escala a produtividade, ocupando menor espaço, produzindo durante todo ano, mantendo a produção isenta de riscos ambientais, climáticos e dentro dos padrões desejáveis de fitossanidade.

2.1 Descrição da espécie – *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini

O sul da África e o Brasil constituem os dois principais centros de dispersão da família Tiliaceae, a qual conta com 50 gêneros e cerca de 450 espécies (CRONQUIST, 1988) das quais aproximadamente 55 a 60, distribuídas em 13 gêneros, ocorrem no Brasil (BARROSO et al., 1978). Essa família possui indivíduos herbáceas ou lenhosos, arbustivos ou arbóreos, com folhas alternas, inteiras e palminérvias, as flores apresentam numerosos estames, com o ovário súpero, e os frutos são geralmente capsulares (AZEVEDO e VALENTE, 2005).

Luehea divaricata Martius et Zuccarini é uma espécie florestal com diversas utilidades, fato este que contribui muito para a redução das populações naturais, tornando necessária a conservação de germoplasma. Conhecida popularmente como açoita-cavalo, caiboti, açoita-cavalo miúdo, ibatingui, pau-de-canga, a espécie ocorre naturalmente desde o Sul da Bahia até o Rio Grande do Sul na mata semidecídua (LORENZI, 2002).

A espécie pode atingir 15-30 m de altura e 50-100 cm de diâmetro à altura do peito (DAP), suas folhas são simples, alternas, dísticas, com estípulas, irregularmente serreadas, com três nervuras típicas, quase glabras na face superior e densamente pubescentes e de cor esbranquiçada na face inferior, com 4,5 e 15 cm de comprimento. A ramificação é irregular e a copa é larga. Apresenta tronco tortuoso, nodoso, com reentrâncias, sendo a base alargada com sapopemas (LORENZI, 2002; CARVALHO, 1994).

As flores hermafroditas são róseas dispostas em inflorescências terminais e axilares, em cimeiras dicotômicas, em torno de 2,5 cm de comprimento e os frutos são cápsulas cônicas, secas, oblongas, pentaloculares, de coloração castanha com densa pilosidade, deiscentes, medindo de 2 a 3 cm de comprimento. O florescimento ocorre de dezembro a julho e a maturação dos frutos, durante os meses de maio a agosto. Cada fruto possui de 5 a 15 sementes. Apresenta germinação lenta e irregular, variável entre 20% e 75%. A viabilidade das sementes é muito irregular. Testadas após 60 dias da colheita germinaram 50% menos do que quando semeadas imediatamente após a coleta (LORENZI, 2002; CARVALHO, 1994). Porém

Cândido (1992, apud CARVALHO, 1994), obteve 45,5% de germinação com sementes armazenadas por 22 meses e apenas 17% com aquelas conservadas por 30 dias.

A madeira é moderadamente pesada, apresentando peso específico básico de 0,6-0,7 g cm⁻³, anéis de crescimento bem distintos, cerne de coloração marrom e avermelhado (RICHTER e DALLWITZ, 2006), resistente e extremamente flexível, sendo muito empregada para estruturas de móveis, confecção de móveis vergados (curvados), peças torneadas, entre outros (LORENZI, 2002). Outra utilidade relevante da espécie é o uso das folhas como fitoterápico, no combate à disenteria, leucorréia, reumatismo, blenorragia e tumores; a infusão das flores, contra bronquite; e a raiz, depurativa (TANAKA et al., 2005). É planta pioneira de rápido crescimento, decídua, heliófita, característica das florestas aluviais (LORENZI, 2002).

2.2 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos vegetais é um processo, através do qual, fragmentos de tecido vivo (explante) são isolados de um organismo e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio nutritivo semidefinido ou definido (MANTEL et al., 1994).

A cultura de tecidos é uma parte importante da biotecnologia, conjuntamente com outras duas áreas: Transformação Genética e Biologia Molecular, e se apóia na teoria da totipotência, que afirma que a célula é autônoma, portanto, contém o potencial necessário para originar um organismo completo, quando submetido a estímulos especiais (CID, 2006).

A propagação de espécies florestais normalmente é via sementes, (RIBAS et al., 2005). Desta maneira, genótipos elite podem perder suas características superiores (não transmitindo à descendência), inclusive a heterose, quando permitida a polinização livre, a menos que sejam multiplicados sob condições controladas (autofecundação ou propagação vegetativa).

Genótipos, se propagados vegetativamente, originam uma descendência geneticamente idêntica e uniforme, coletivamente designados como um clone. Os métodos de propagação artificial de espécies florestais são amplamente usados, destacando-se as técnicas de enxertia e estaquia. Essa propagação clonal com fidelidade ao tipo original também pode ser efetuada *in vitro*, com a possibilidade de ser mais rápida que a estaquia e a enxertia.

As principais vantagens do cultivo *in vitro*, em relação a outros métodos de propagação vegetativa, são o curto período de tempo e o pequeno espaço físico necessários para produzir um grande número de indivíduos a partir de um explante inicial (KIRST e SEPEL, 1996).

Termignoni (2005) cita como as principais aplicações da cultura de tecidos atualmente a preservação de espécies em extinção, a produção massal de indivíduos geneticamente superiores, a obtenção de plantas geneticamente transformadas, e a obtenção de sistemas *in vitro* para a produção de metabólitos secundários.

Apesar de existirem diversas técnicas, a cultura de tecidos é uma só, e o denominador comum de todas elas é a assepsia, o explante, a composição do meio de cultura, reguladores de crescimento e as condições ambientais (CID, 2006; MANTOVANI, 1998).

As primeiras técnicas de cultivo *in vitro* surgiram no início do século XX. Diversas experiências foram realizadas em diferentes países do mundo. Muitas fontes de explantes, diversos meios de cultura e condições ambientais foram testadas sem que houvesse uma definição de um protocolo único para todas as espécies, fato este devido às diferentes necessidades de cada planta, com relação a nutrientes, fotoperíodo, fisiologia, etc. (TORRES et al., 1998).

2.2.1 Micropropagação

A propagação vegetativa *in vitro* ou clonagem *in vitro*, também denominada micropropagação devido ao tamanho dos propágulos utilizados, é

a técnica de cultivo *in vitro* de maior impacto dentre as diversas técnicas de cultura de tecidos e tem mostrado enorme importância prática e potencial nas áreas agrícola, florestal e hortícola (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; BORGATTO e HAYASHI, 2002). A técnica viabiliza a clonagem de várias espécies, permitindo a formação de indivíduos geneticamente idênticos a partir de células, órgãos ou pequenos fragmentos de uma planta (SOUZA e JUNGHANS, 2006), que são cultivados em frascos contendo meio nutritivo, sob condições ambientais controladas, por períodos indefinidos, até a formação da nova muda para posterior aclimatização.

A aplicação da micropropagação tem sido menos intensa em espécies lenhosas e o emprego na área florestal iniciou realmente na década de 80, concentrando-se nos principais gêneros de interesse comercial, como *Pinus*, *Eucalyptus*, *Picea* e *Populus* (HARTNEY, 1979; PARANJOTHY et al., 1990), apesar de ter sido implementada tardiamente é uma ferramenta muito útil na multiplicação de espécies florestais de importância econômica ou que se encontram em extinção como *Pinus pinaster* (RIBAS et al., 2005; GOMES et al., 1999 apud RIBAS, 2005), no entanto, não existem relatos na literatura sobre a micropropagação de açoita-cavalo.

Durante os últimos anos, houve um expressivo acréscimo no uso da propagação vegetativa *in vitro* como ferramenta para a implantação de florestas clonais, substituindo-se as práticas convencionais por alternativas que passaram a garantir a superioridade genética dos indivíduos (BASSAN, 2006). Como forma de propagação vegetativa, a micropropagação torna-se uma alternativa para a regeneração de plantas que apresentam dificuldade de reprodução natural, baixo poder germinativo e, também, para aqueles casos em que os métodos convencionais de propagação vegetativa não são viáveis (THORPE et al., 1991; SERAFINI et al., 2001).

A micropropagação ganhou grande impulso na década de 1970 e, neste período, surgiu o conceito de estágios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*, elaborado por Murashige (1974, apud GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998):

- Estágio I – seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas;

- Estágio II – multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação;
- Estágio III – transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para substrato ou solo.

Para Grattapaglia e Machado (1998), conforme o explante e a subsequente manipulação, a micropropagação pode ser conduzida por três maneiras distintas: a) multiplicação por meio de proliferação de gemas axilares; b) multiplicação mediante a indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta (passando pela fase de calo); e c) multiplicação via embriogênese somática.

O estabelecimento das culturas é a fase inicial da micropropagação, em que o explante mais adequado é selecionado; essa etapa é concluída com a obtenção de uma cultura livre de contaminantes visíveis e suficientemente adaptada às condições *in vitro*, de modo que apresente reação à aplicação de fitorreguladores na fase seguinte de multiplicação (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Infinitas dificuldades estão sendo encontradas para a micropropagação de espécies lenhosas, dentre estas se pode citar a oxidação fenólica que pode dificultar o estabelecimento *in vitro*, é causada pela liberação de compostos fenólicos, ocorrendo devido ao dano causado nas células durante a excisão dos explantes (FLORES et al., 1998). Outro entrave encontrado para o uso extensivo da micropropagação é a obtenção de culturas livres de contaminação, principalmente por bactérias, pois nem sempre se pode eliminá-las com o uso de antibióticos (CHAVES et al., 2005); além disso, a recalcitrância *in vitro* (falta de resposta morfogênética) deve ser observada, e as espécies lenhosas em particular, possuem destaque entre as espécies recalcitrantes (SOUZA e JUNGHANS, 2006).

A variabilidade observada nos resultados, decorrentes de características inerentes às plantas (genótipo, idade e condições fisiológicas) ou ao meio ambiente, é outra característica das metodologias de micropropagação (PARANJOTHY et al., 1990). Para Vasil (1987), a competência morfogênética

in vitro é complexa e indiretamente influenciada por fatores fisiológicos e ambientais.

2.2.2 Desinfetação superficial e germinação asséptica de sementes

Uma das maiores dificuldades no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas está na obtenção de tecidos livres de contaminação (BIANCHI et al., 2003), tendo em vista que permanecem um bom período no campo, estando mais susceptíveis aos microorganismos (bactérias, fungos, entre outros). Em função disso, são rotineiramente contaminadas tanto interna como externamente por patógenos que são difíceis de controlar, sendo que a desinfestação e desinfecção podem causar danos aos tecidos ou mesmo levá-los à morte (ANDRADE et al., 2000). Pelo exposto, torna-se mais fácil e eficiente trabalhar com plântulas oriundas de sementes germinadas assepticamente, pois assim os explantes são excisados de material juvenil e livre de contaminantes.

Os microrganismos contaminantes competem com o vegetal pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar no meio, metabólitos tóxicos às plantas (MONTARROYOS, 2000).

Segundo Cid (2006) a assepsia é entendida como um conjunto de técnicas para tornar um explante livre de microorganismos. Para o autor, na obtenção de explantes livres de contaminantes é inevitável a utilização de antissépticos, sejam estes bacteriostáticos (inibem o crescimento de bactérias nas fases iniciais do cultivo) ou germicidas, associada a uma manipulação correta dos explantes em ambiente axênico (livre de contaminantes).

Existem diversas substâncias que podem ser utilizadas para a assepsia do material vegetal, dentre estas se podem citar os antibióticos, álcoois (etanol), halogênicos (hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio), sais de metais pesados (cloreto de mercúrio) e fungicidas orgânicos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; CID, 2006). Os agentes desinfestantes podem ser

utilizados de maneira associada ou não, para uma maior eficiência do protocolo de desinfestação. Outro agente que possui duas vias de ação é a água quente, que age tanto na desinfestação superficial como na quebra de dormência (MARTINS-CORDER e BORGES JR, 1999).

Os fungicidas podem ser classificados como de contato, protetores e sistêmicos. Os fungicidas de contato são aqueles que agem diretamente sobre o patógeno, na fonte de inóculo, ao contrário dos sistêmicos que atenuam os sintomas ou reparam os danos provocados pelo patógeno (KIMATI, 1995). Thiabendazole e Metalaxil são classificados como fungicidas sistêmicos e Captan é um fungicida de contato.

A concentração da solução, a combinação dos princípios ativos e o tempo de exposição podem variar muito (MONTARROYOS, 2000 apud CHAVES, 2005), fazendo-se necessária, portanto, a definição de um protocolo eficiente de desinfestação de acordo com a espécie e com a sensibilidade do tecido a ser desinfestado.

2.2.3 Explante e meio de cultura

Segundo Puga et al. (1991), explante é o órgão ou parte de tecido da planta, o qual será utilizado para iniciar um cultivo *in vitro* em experimentos de micropropagação. Para Grattapaglia e Machado (1998), diversos explantes podem ser utilizados para iniciar a propagação *in vitro* de uma planta, a escolha do explante apropriado constitui o primeiro passo para o estabelecimento *in vitro* dos cultivos. De acordo com Termignoni (2005), o uso de ápices e de segmentos caulinares é bastante comum entre os micropropagadores pela facilidade de obtenção, pelo número inicial de explantes isolados da planta-mãe, pela viabilidade *in vitro* e pelo crescimento rápido. As gemas apicais têm demonstrado uma maior capacidade de crescimento em relação às gemas axilares, que estão sob efeito da dominância apical. Isto é comum em plantas herbáceas ornamentais e olerícolas, sendo que o contrário, em geral, vale para plantas arbóreas.

Quanto à idade dos explantes para espécies lenhosas são indicados os provenientes de organismos jovens, pois uma série de alterações na capacidade morfogênica dos tecidos podem ocorrer com a passagem do estado juvenil para o adulto (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Os meios de cultivo possuem grande quantidade de macro e micronutrientes em diferentes proporções, responsáveis pelo crescimento da planta como um todo, carboidratos como fonte de carbono (sacarose, glucose, maltose), vitaminas (tiamina, piridoxina e ácido ascórbico), além de outros nutrientes como inositol e sorbitol (DAMIÃO FILHO, 1995; HU e FERREIRA, 1998).

Os meios de cultura, segundo Torres et al. (1998), além de fornecer as substâncias essenciais para o crescimento, também controlam o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Thorpe et al. (1991) revisaram os meios de cultura que têm sido utilizados para a regeneração de espécies de diferentes gêneros, alguns desses meios foram especificamente formulados para fornecer os requisitos particulares à espécie em estudo, como o meio básico de cultura de Murashige & Skoog - MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), desenvolvido, inicialmente, para tecido medular de *Nicotiana tabacum*, e o Woody Plant Medium (WPM) elaborado por Lloyd e McCown (1981), para a propagação de plantas lenhosas.

2.2.4 Orientação do explante e citocininas

Diversos são os tratamentos que podem ser dados aos explantes para estimular o seu desenvolvimento *in vitro*, tais como redução na concentração de sacarose, acréscimo de carvão ativado ao meio de cultura, uso de reguladores de crescimento, alterações no fotoperíodo, emprego de diferentes agentes geleificantes no meio nutritivo, orientação do explante no frasco entre outros.

Vieitez et al. (1993) obtiveram uma eficiente produção de brotações em *Quercus rubra* combinando três tratamentos que favoreceram o crescimento

das gemas laterais: excisão do ápice, cultivo na orientação horizontal e tratamento com citocininas. Lane (1979) quebrou a dominância apical em explantes de *Pyrus*, retirando o ápice ou inoculando as partes aéreas deitadas sobre o meio de cultura e, para Yae et al. (1987), a orientação horizontal mostrou ser superior à vertical para vários clones de “Delicious”, apesar de ter pouco efeito em outras cultivares testadas.

Dentre os pontos mais importantes na multiplicação *in vitro* destacam-se aqueles referentes às concentrações de citocinina e o tipo de meio de cultivo a ser utilizado (CHAVES et al., 2005). As citocininas são reguladores de crescimento que desempenham um papel fundamental no crescimento e morfogênese em cultura de tecidos, estimulando a divisão celular, bem como, a indução e a proliferação de brotações adventícias (GEORGE e SHERRINGTON, 1984 apud FLORES et al., 1998).

A adição de reguladores de crescimento na cultura de tecidos tem o objetivo principal de suprir as deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz. Das citocininas comercialmente disponíveis a 6-benzilaminopurina (BAP) é a que, em geral, apresenta os melhores resultados (BORGATTO e HAYASHI, 2002). As concentrações podem variar de acordo com a espécie, Torres et al. (2001) recomendam a utilização de concentrações entre 0,03 a 30 mg L⁻¹.

O uso exagerado deste regulador de crescimento (BAP) é tóxico e caracteriza-se, principalmente, pela falta de alongamento das culturas, redução da área foliar, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado do caule, vitrificação generalizada (LESHEN et al., 1988 apud CHAVES et al., 2005).

A maneira complexa com que os reguladores de crescimento e as células interagem indica que, se o tecido não está em um estágio responsivo, ele não irá responder adequadamente aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações esses reguladores são utilizados. A ausência na resposta a um regulador de crescimento é frequentemente um problema em cultivos *in vitro* (BONGA e VONADERKAS, 1992 apud ALVES et al., 2004).

Apesar das adversidades encontradas na micropropagação de espécies lenhosas, as vantagens do emprego de clones de plantas elite estimulam o desenvolvimento de protocolos mais eficientes de micropropagação (DURZAN, 1988).

3 CAPÍTULO I – DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL E GERMINAÇÃO ASSÉPTICA DE SEMENTES DE AÇOITA-CAVALO

3.1 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de desinfestação para germinação asséptica de sementes de açoita-cavalo, visando à obtenção de plântulas sadias que, posteriormente, serão fontes de explantes para a micropropagação.

3.2 Material e métodos

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

As sementes foram coletadas e armazenadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro/Florestas em Santa Maria, RS, em 2004 e 2005.

Para definição de um protocolo eficiente de desinfestação e germinação asséptica foram desenvolvidos quatro experimentos.

3.2.1 Experimento I

O meio de cultivo utilizado para a germinação das sementes foi o meio base MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (ANEXO A), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,7. Posteriormente, os frascos foram autoclavados por 15 minutos à temperatura de 121 °C e 1 atm.

Para a desinfestação superficial das sementes foram utilizados cinco tratamentos:

T1 (testemunha) - imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 10 minutos;

T2 - imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 10 minutos + imersão em solução de fungicida Thiabendazole a 8 g L⁻¹ por 10 minutos;

T3 - imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 10 minutos + imersão em solução de fungicida Metalaxil a 8 g L⁻¹ por 10 minutos;

T4 - imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 10 minutos + imersão em solução de fungicida Thiabendazole mais fungicida Metalaxil nas concentrações de 4 g L⁻¹ e 4 g L⁻¹, respectivamente, por 10 minutos;

T5 - imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 10 minutos + imersão em solução de fungicida Thiabendazole mais fungicida Metalaxil nas concentrações de 8 g L⁻¹ e 8 g L⁻¹, respectivamente, por 10 minutos;

Em todos os tratamentos, após a imersão em cada solução desinfestante, as sementes foram submetidas a um triplo enxágüe com água destilada estéril para remoção do resíduo das soluções desinfestantes.

As sementes foram inoculadas sob condições assépticas em mesa de fluxo laminar e a unidade experimental (UE) foi composta de quatro frascos de vidro, com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo e quatro sementes cada. Posteriormente, os frascos foram vedados com papel alumínio e dispostos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas de luz, $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

A avaliação foi realizada aos 56 dias de cultivo. As variáveis observadas foram germinação (%), contaminação fúngica (%) e contaminação bacteriana (%).

As variáveis foram transformadas para raiz quadrada de $X + 0,5$, dividida por 100, sendo X o valor observado. Foram realizadas análises de variância e as médias, quando necessário, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico *Statistica* (STASOFT, 1998).

3.2.2 Experimento II

O meio de cultivo utilizado para a germinação das sementes foi o meio base MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (ANEXO A), acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e 7 g L^{-1} de ágar, sendo o pH ajustado para 5,7. Posteriormente, os frascos foram autoclavados por 15 minutos à temperatura de 121°C e 1 atm.

Para a desinfestação superficial das sementes foram utilizados quatro tratamentos:

T1 (testemunha) – imersão em água quente ($\pm 60^\circ\text{C}$) por 10 minutos + imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 10 minutos + imersão em solução de fungicida Captan na concentração de 2 g L^{-1} por 10 minutos;

T2 – imersão em água quente ($\pm 60^{\circ}\text{C}$) por 10 minutos + imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 10 minutos + imersão em solução de fungicida Captan na concentração de 10 g L^{-1} por 10 minutos;

T3 – imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 10 minutos + imersão em solução de fungicida Captan na concentração de 2 g L^{-1} por 10 minutos;

T4 – imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 10 minutos + imersão em solução de fungicida Captan na concentração de 10 g L^{-1} por 10 minutos;

Em todos os tratamentos, após a imersão em cada solução desinfestante, as sementes foram submetidas a um triplo enxágüe com água destilada estéril para remoção do resíduo das soluções desinfestantes.

As sementes foram inoculadas sob condições assépticas em mesa de fluxo laminar e a unidade experimental (UE) foi composta de quatro frascos de vidro, com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo e quatro sementes cada. Posteriormente, os frascos foram vedados com papel alumínio e dispostos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas de luz, $20\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

A avaliação foi realizada aos 56 dias de cultivo. As variáveis observadas foram germinação (%), contaminação fúngica (%) e contaminação bacteriana (%).

As variáveis foram transformadas para raiz quadrada de $X + 0,5$, dividida por 100, sendo X o valor observado. Foram realizadas análises de variância e as médias, quando necessário, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico *Statistica* (STASOFT, 1998).

3.2.3 Experimento III

O meio de cultivo utilizado para a germinação das sementes foi o meio base MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (ANEXO A), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,7. Posteriormente, os frascos foram autoclavados por 15 minutos à temperatura de 121 °C e 1 atm.

Para a desinfestação superficial das sementes foram utilizados cinco tratamentos:

T1 (testemunha) - imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em solução de hipoclorito de sódio a 3% por 10 minutos;

T2 - imersão em água quente ($\pm 60^{\circ}\text{C}$) por 10 minutos + imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em solução de hipoclorito de sódio a 3% por 10 minutos;

T3 - imersão em água quente ($\pm 60^{\circ}\text{C}$) por 10 minutos + imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em hipoclorito de sódio a 3% por 10 minutos + imersão em solução de fungicida Captan (10 g L⁻¹) por 10 minutos;

T4 - imersão em água quente ($\pm 60^{\circ}\text{C}$) por 10 minutos + imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em hipoclorito de sódio a 3% por 10 minutos + imersão em solução de fungicida Captan (10 g L⁻¹) por 10 minutos + imersão em solução de fungicida Thiabendazole (8 g L⁻¹) por 10 minutos;

T5 - imersão em água quente ($\pm 60^{\circ}\text{C}$) por 10 minutos + imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em hipoclorito de sódio a 3% por 10 minutos + imersão em solução de fungicida Thiabendazole (8 g L⁻¹) por 10 minutos.

Em todos os tratamentos, após os procedimentos de desinfestação, as sementes foram submetidas a um triplo enxágüe com água destilada para remoção do resíduo das soluções desinfestantes.

As sementes foram inoculadas sob condições assépticas em mesa de fluxo laminar e a unidade experimental (UE) foi composta de quatro frascos de vidro, com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo e três sementes cada. Posteriormente, os frascos foram vedados com papel alumínio e dispostos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas de luz, $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

A avaliação foi realizada aos 60 dias de cultivo. As variáveis observadas foram germinação (%), contaminação fúngica (%) e contaminação bacteriana (%).

As variáveis foram transformadas para raiz quadrada de $X + 0,5$, dividida por 100, sendo X o valor observado. Foram realizadas análises de variância e as médias, quando necessário, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico *Statistica* (STASOFT, 1998).

3.2.4 Experimento IV

O meio de cultivo utilizado para a germinação das sementes foi o meio base MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (ANEXO A), acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e 7 g L^{-1} de ágar, sendo o pH ajustado para 5,7. Posteriormente, os frascos foram autoclavados por 15 minutos à temperatura de 121°C e 1 atm.

Para a desinfestação superficial das sementes foram utilizados sete tratamentos:

T1 (testemunha) - imersão em água quente ($\pm 60^\circ\text{C}$) por 10 minutos + imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em solução de hipoclorito de sódio a 3% por 10 minutos + imersão em solução de cloreto de mercúrio a 0,05% por 10 minutos;

T2 - imersão em água quente ($\pm 60^{\circ}\text{C}$) por 10 minutos + imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em solução de hipoclorito de sódio a 3% por 10 minutos + imersão em solução de cloreto de mercúrio a 0,1% por 10 minutos;

T3 - imersão em água quente ($\pm 60^{\circ}\text{C}$) por 10 minutos + imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em hipoclorito de sódio a 3% por 10 minutos + imersão em solução de cloreto de mercúrio a 0,2% por 5 minutos;

T4 - imersão em água quente ($\pm 60^{\circ}\text{C}$) por 10 minutos + imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em hipoclorito de sódio a 3% por 10 minutos + imersão em solução de cloreto de mercúrio a 0,3% por 5 minutos;

T5 - imersão em água quente ($\pm 60^{\circ}\text{C}$) por 10 minutos + imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em hipoclorito de sódio a 3% por 10 minutos + imersão em solução de cloreto de mercúrio a 0,4% por 5 minutos;

T6 - imersão em água quente ($\pm 60^{\circ}\text{C}$) por 10 minutos + imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em hipoclorito de sódio a 3% por 10 minutos + imersão em solução de cloreto de mercúrio a 0,5% por 3 minutos;

T7 - imersão em água quente ($\pm 60^{\circ}\text{C}$) por 10 minutos + imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 segundos + imersão em hipoclorito de sódio a 3% por 10 minutos + imersão em solução de cloreto de mercúrio a 0,6% por 5 minutos;

Em todos os tratamentos, após os procedimentos de desinfestação, as sementes foram submetidas a um triplo enxágüe com água destilada seguido de enxágüe em solução de carvão ativado (CA) na concentração de 0,5% para remoção do resíduo das soluções desinfestantes.

As sementes foram inoculadas sob condições assépticas em mesa de fluxo laminar e a unidade experimental (UE) foi composta de um frasco de vidro, com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo e quatro sementes cada. Posteriormente, os frascos foram vedados com papel alumínio

e dispostos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas de luz, $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em delineamento inteiramente casualizado, com vinte repetições por tratamento.

A avaliação foi realizada aos 60 dias de cultivo. As variáveis observadas foram germinação (%), contaminação fúngica (%) e contaminação bacteriana (%).

As variáveis foram transformadas para raiz quadrada de $X + 0,5$, dividida por 100, sendo X o valor observado. Foram realizadas análises de variância e as médias, quando necessário, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico *Statistica* (STASOFT, 1998).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Resultados e discussão do experimento I

Os tratamentos não foram estatisticamente significativos para nenhuma das variáveis analisadas (Figura 1), altas médias de contaminação fúngica foram observadas em todos os tratamentos, fato que pode ter influenciado os baixos valores observados tanto para contaminação bacteriana como para germinação das sementes, tendo em vista que a contaminação fúngica (em maior escala) ocorreu logo na primeira semana de cultivo.

As médias de germinação, apesar de serem baixas, são consideradas normais, quando comparadas com a taxa de germinação da espécie e do lote de sementes de 2004, que fica em torno de 20-75% e 26,5% (APÊNDICE A), respectivamente. O tratamento T4 apresentou a média de germinação de 28,75% e o tratamento T2 a média 10%.

Os fungicidas Thiabendazole e Metalaxil não foram eficientes no controle dos fungos existentes nas sementes de açoita-cavalo, por serem

estes, fungicidas sistêmicos o tempo de exposição das sementes ao fungicida pode ter sido inferior ao necessário para que este agisse sobre os fungos.

A utilização de hipoclorito de sódio e etanol, nas concentrações e tempos de imersão, utilizados neste experimento, não foram satisfatórios para o controle dos contaminantes existentes nas sementes de açaíta-cavalo (APÊNDICE B), o que contrastam com os resultados encontrados por Andrade et al. (2000), em estudos realizados com *Myracrodruon urundeuva* Fr. All, onde esses autores utilizaram para uma desinfestação eficiente a imersão dos frutos-sementes em solução em etanol a 70% por 30 segundos, seguida de imersão em solução hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos e lavagem por três vezes em água destilada.

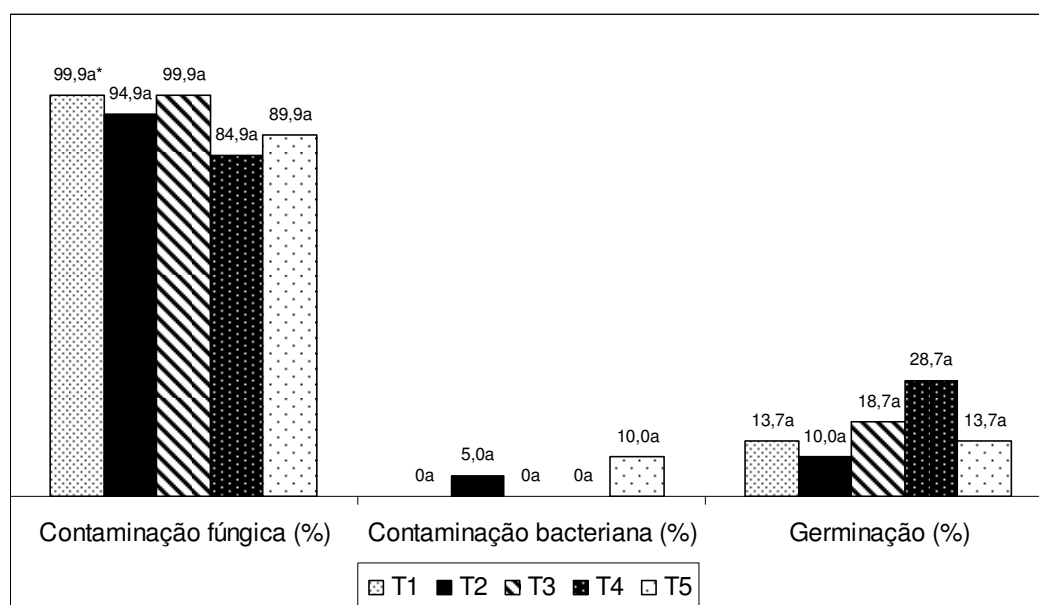


Figura 1 – Percentual de contaminação fúngica, contaminação bacteriana e germinação de sementes de *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini cultivadas *in vitro*. Santa Maria, RS, 2007.

*Médias não seguidas de mesma letra, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Resultados positivos com relação à desinfestação de sementes foram obtidos por Sabá et al. (2002) com a espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf, sendo que as sementes foram imersas em solução de etanol (puro) por três

minutos, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 3% por 20 minutos e lavadas por três vezes em água destilada autoclavada.

Chaves et al. (2005) observaram que apenas a imersão em etanol, seguida de imersão em hipoclorito de sódio, ou apenas a utilização de um ou outro desinfestante, era suficiente para controlar a contaminação em sementes de *Physalis peruviana* L., sem que estes agentes prejudicassem a germinação da espécie.

3.3.2 Resultados e discussão do experimento II

Para contaminação fúngica e germinação houve diferença significativa entre os tratamentos utilizados, porém para contaminação bacteriana não houve significância.

Os tratamentos T1 e T2 não diferem entre si e foram superiores aos tratamentos T3 e T4, onde a contaminação fúngica foi bastante severa (Figura 2). Estes resultados inferem que a imersão em água quente é essencial para o controle dos fungos, pois aqueles tratamentos que não possuem água quente (T3 e T4), mesmo possuindo outro agente fungicida, o Captan, não demonstraram eficiência no controle destes microrganismos.

A utilização de água quente aumentou a germinação das sementes de açaíta-cavalo, já que foi eficiente no controle de fungos, os quais competiam com o vegetal. Em sementes de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch., Franco e Ferreira (2002) observaram que a imersão das sementes em água quente (80°C) por 10 minutos inibiu a germinação da espécie.

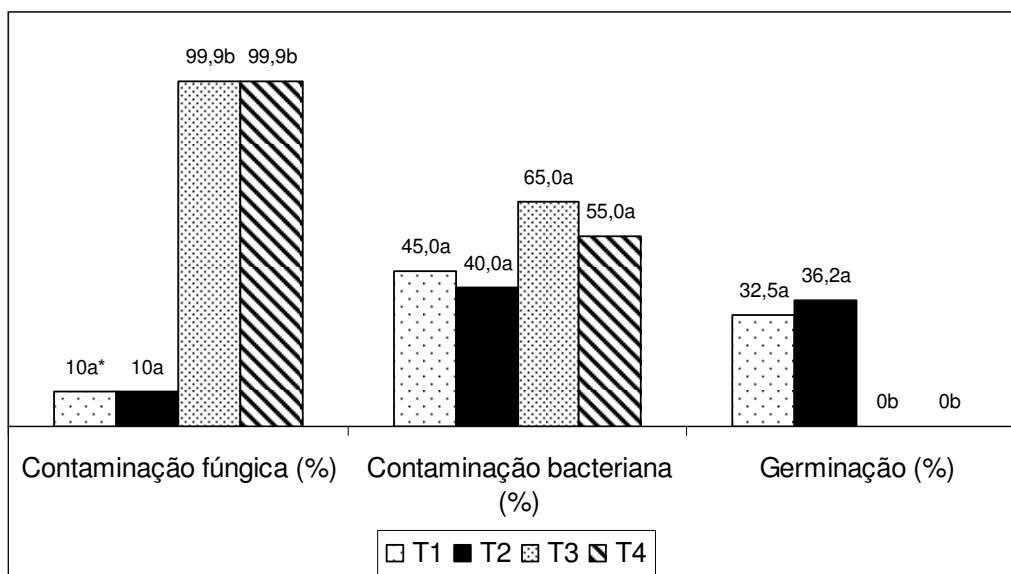


Figura 2 – Médias de contaminação fúngica, contaminação bacteriana e germinação de sementes de açaite-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini) submetidas a diferentes tratamentos de desinfestação, Santa Maria, RS, 2007.

* Médias não seguidas de mesma letra, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A água quente, além de agente desinfestante, também pode ter agido na quebra de dormência das sementes, mesmo Carvalho (1994) afirmando que o açaite-cavalo não possui dormência, a espécie é classificada como intermediária, pois possui características tanto de sementes recalcitrantes, como de ortodoxas e, dessa maneira, a água quente pode ter rompido algum mecanismo de dormência da espécie, favorecendo a germinação.

No que se refere ao fungicida Captan, este não apresentou toxicidade ao vegetal nas concentrações testadas (2 e 10 g L⁻¹), pois não afetou a germinação que foi de 32,5% e 36,2% em T1 e T2, respectivamente, resultado superior ao verificado no teste de germinação do lote de 2004 (APÊNDICE A). O fungicida ainda auxiliou no controle aos fungos, sua utilização é importante desde que associado aos outros agentes desinfestantes. Sugere-se utilizar a menor dose (2 g L⁻¹) para reduzir custos e minimizar os danos ao meio ambiente.

Para contaminação bacteriana, mesmo que os tratamentos não tenham diferenças estatísticas, nos tratamentos T1 e T2 foram encontradas as médias de 45 e 40%, respectivamente.

3.3.3 Resultados e discussão do experimento III

Não houve diferença significativa entre os tratamentos de desinfestação para as variáveis germinação e contaminação fúngica. Em relação à contaminação bacteriana, o tratamento T5 não apresentou crescimento destes microrganismos. O tratamento T1, por sua vez, apresentou 55% de contaminação por bactérias e 62,5% de contaminação fúngica (Figura 3), o que pode ser atribuído à ausência de imersão das sementes em água quente. Esse procedimento parece ser fundamental para o controle da contaminação bacteriana e fúngica *in vitro* de sementes de açaíta-cavalo. Os tratamentos T2, T3 e T4 apresentaram níveis de contaminação entre T5 e T1.

Observou-se que o tratamento T5, com média de contaminação bacteriana de 0%, manifestou resultado similar aos tratamentos T2 e T3, ratificando a idéia de que a imersão das sementes em água quente é um procedimento necessário para o controle destes microrganismos.

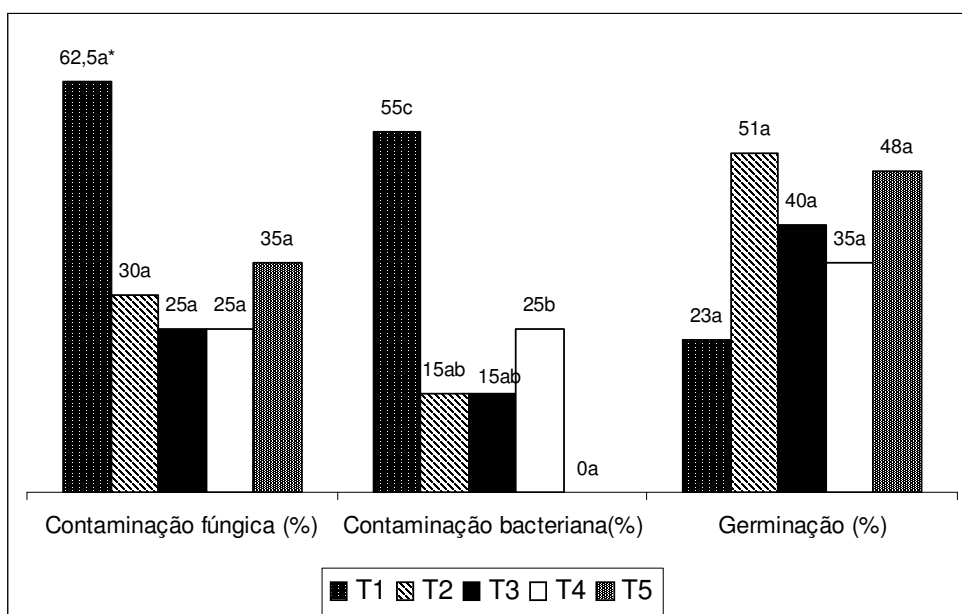


Figura 3 – Percentual de contaminação fúngica, contaminação bacteriana e germinação de sementes de *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini cultivadas *in vitro*. Santa Maria, RS, 2007.

* Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

Os tratamentos de desinfestação não diferiram estatisticamente para a variável germinação, sendo observada uma porcentagem de 23 a 51% de sementes germinadas nos diferentes tratamentos, taxa que está próxima da verificada no teste de germinação do lote 2004 (APÊNDICE A).

3.3.4 Resultados e discussão do experimento IV

Não houve diferenças significativas para nenhuma das variáveis testadas, porém, apesar de não haver significância, as médias de contaminação, tanto fúngica como bacteriana, foram menores que nos experimentos anteriores e a germinação ficou dentro dos padrões de germinação para a espécie.

As taxas mais altas de contaminação fúngica foram encontradas nos tratamentos T1 e T2, com 28,7% e 30%, respectivamente. Nesses tratamentos foram utilizadas concentrações menores de cloreto de mercúrio por tempos de imersão mais prolongados. Concentração de 0,05% de cloreto de mercúrio por 10 minutos foi utilizada para desinfestação de explantes de *Aspidosperma polineuron*, com eficácia comprovada por Ribas et al. (2005). Isso indica que baixas concentrações não afetam os tecidos mais sensíveis, porém, para a desinfestação de sementes que possuem tecidos mais resistentes são necessárias concentrações mais elevadas.

O tratamento T6 apresentou a média de contaminação fúngica de 7,5%, e a contaminação bacteriana foi ausente nesse tratamento, associada a isso uma boa taxa de germinação foi observada, 52,5%, indicando que este tratamento foi eficiente no controle dos microrganismos associados às sementes do lote de 2005 (APÊNDICES A e B) (Figuras 4 e 5).

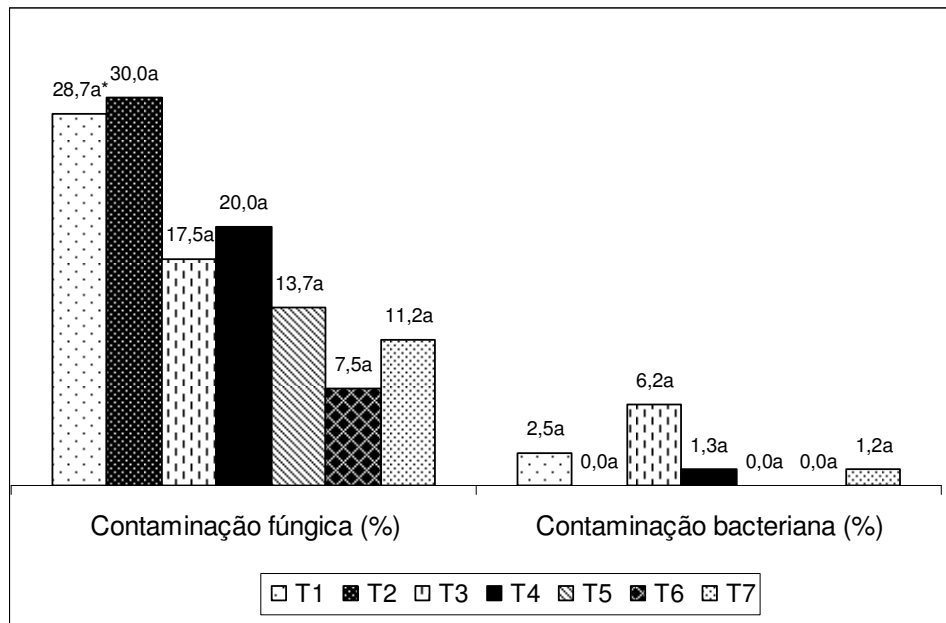


Figura 4 – Médias de contaminação fúngica e bacteriana em sementes germinadas *in vitro* de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini). Santa Maria, RS, 2007.

* Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

Tavares et al. (2004) desinfestaram sementes de arroz (cultivar BRS 7 “Taim”) expondo-as às soluções de álcool 70% por 3 minutos, solução de hipoclorito de sódio 40% (produto comercial) por 40 minutos, seguido de três lavagens em água destilada estéril e, por fim, solução de cloreto de mercúrio 0,6% por 10 minutos, seguido de quatro lavagens em água destilada estéril, procedimento semelhante ao tratamento T6.

Pereira et al. (1999) utilizaram plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro* como fonte de explantes para experimentos com cultura de tecidos, e para a desinfestação superficial das sementes utilizaram o seguinte protocolo: imersão por 10 minutos em cloreto de mercúrio (0,6%) e por 20 minutos em hipoclorito de sódio (1%), seguida de três lavagens em água destilada esterilizada. A utilização de cloreto de mercúrio vem sendo empregada por micropropagadores como uma alternativa para desinfestação de explantes e sementes, na fase de estabelecimento *in vitro*, fase esta em que a contaminação por microrganismos é um fator limitante.

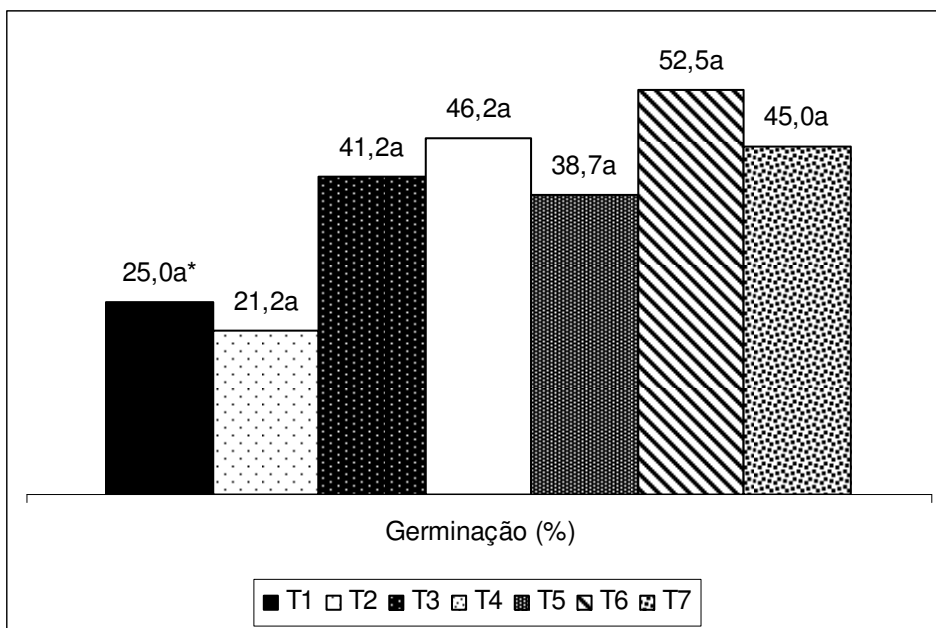


Figura 5 – Médias de germinação *in vitro* de sementes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini). Santa Maria, RS, 2007.

* Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

O cloreto de mercúrio não atuou negativamente sobre a germinação das sementes, mas apresentou efeito tóxico. A maioria das plântulas apresentaram folhas amareladas em todos os tratamentos (Figura 6), contudo explantes retirados destas plântulas foram utilizados em experimentos subsequentes *in vitro* e responderam bem aos tratamentos aplicados.

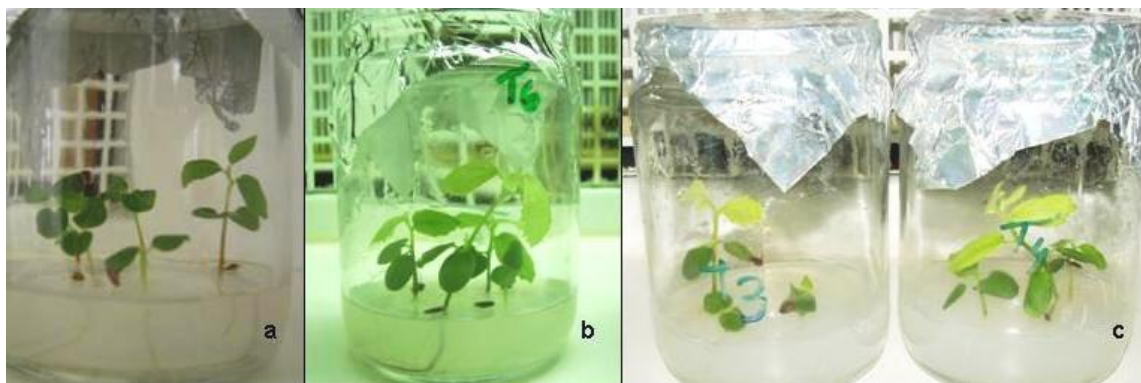


Figura 6 – Aspecto de plântulas de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini) germinadas *in vitro* (a- plântulas não tratadas com cloreto de mercúrio; b e c- plântulas amareladas, tratadas com cloreto de mercúrio). Santa Maria, RS, 2007.

3.4 Conclusão

A imersão das sementes em água quente é fundamental para o controle (parcial) de microrganismos associados às sementes, bem como promover uma maior taxa de germinação.

O cloreto de mercúrio controlou parcialmente a contaminação fúngica e totalmente a contaminação bacteriana, porém demonstrou toxicidade ao desenvolvimento das plântulas, com o aparecimento de folhas amareladas.

Os tratamentos testados não foram eficazes em promover a desinfestação superficial relacionada à presença de fungos, uma vez que estes microrganismos estiveram presentes em todos os tratamentos testados.

4 CAPÍTULO II - SELEÇÃO DE MEIO DE CULTIVO E EXPLANTE DE *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini PARA O ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

4.1 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi determinar o tipo de explante e o meio de cultivo mais eficientes para o estabelecimento *in vitro*, visando à micropropagação de açoita-cavalo.

4.2 Materiais e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da UFSM, em Santa Maria, RS.

Os explantes testados foram excisados de plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro* com 40-50 dias de idade, as sementes foram coletadas e armazenadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro/Florestas em Santa Maria, RS, em 2005.

Os tratamentos consistiram em dois tipos de explantes: ápices caulinares e segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento, associados a dois diferentes meios de cultura, o meio base MS e o WPM

(ANEXO A), sendo estes acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,7. Posteriormente, os meios foram autoclavados por 15 minutos à temperatura de 121 °C e 1 atm.

Os explantes foram inoculados sob condições assépticas em mesa de fluxo laminar e a unidade experimental (UE) foi composta por quatro frascos de vidro, com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio e um explante cada. Posteriormente, os frascos foram vedados com papel alumínio e dispostos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas de luz, 20 µmol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 25 ± 2 °C, em delineamento inteiramente casualizado, em esquema bifatorial (2 meios nutritivos x 2 tipos de explantes) com cinco repetições por tratamento.

A avaliação foi realizada aos 60 dias de cultivo e as variáveis observadas foram sobrevivência, estabelecimento, número de nós, número de folhas, presença de calo e presença de raiz. A sobrevivência foi indicada pela coloração verde do explante e o estabelecimento, pela formação de novas gemas ou folhas.

As variáveis sobrevivência, estabelecimento, número de nós e número de folhas foram transformadas para raiz quadrada de X, presença de calo e presença de raiz foram transformadas para raiz quadrada de X + 0,5, sendo X o valor observado. Foram realizadas análises de variância e as médias comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico *Statistica* (STASOFT, 1998).

4.3 Resultados e discussão

Para a interação e para os efeitos principais meio de cultivo e tipo de explante não houve diferenças significativas entre os tratamentos para a maioria das variáveis analisadas, exceto para a presença de raiz (Tabela 1), em que foi observada a influência do meio nutritivo sobre o enraizamento de açoita-cavalo.

Os resultados obtidos demonstraram que o estabelecimento *in vitro* desta espécie pode ser efetuado, com sucesso, em ambos os meios testados, empregando-se tanto ápices caulinares quanto segmentos nodais.

Tabela 1 – Análise de variância para a variável formação de raiz em explantes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini). Santa Maria, RS, 2007.

Causa de Variação	GL	Quadrado Médio	F
Meio nutritivo	1	27,2282	6,87*
Tipo de explante	1	4,1369	1,04
Meio * tipo de explante	1	0,0004	0,00
Resíduo	16	3,9646	
Total	19		

* F significativo a 5% de probabilidade de erro.

Contudo, para que ocorra a formação de raízes há diferenças entre os meios (Figura 1). O enraizamento em açoita-cavalo, independente do tipo de explante, foi superior no meio WPM (70,83%) em comparação ao observado no meio MS (42,50%). Deccetti (2000) observou um alto percentual de enraizamento e maior número de raízes em *Annona glabra* na ausência de reguladores de crescimento e Brum (2001), trabalhando com enraizamento de brotações de *Ficus carica* L., também afirma que não é necessário utilizar reguladores de crescimento para o enraizamento, o que também é verificado na espécie açoita-cavalo que apresentou enraizamento elevado na ausência de reguladores de crescimento.

Mantovani et al. (2001) verificaram um enraizamento para *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex teudel (louro-pardo) de 73%, quando utilizado o meio WPM com a adição de ácido 3-Indolbutírico (AIB) na concentração de 1,5 mg L⁻¹ + carvão ativado (CA) na concentração de 1,5 g L⁻¹.

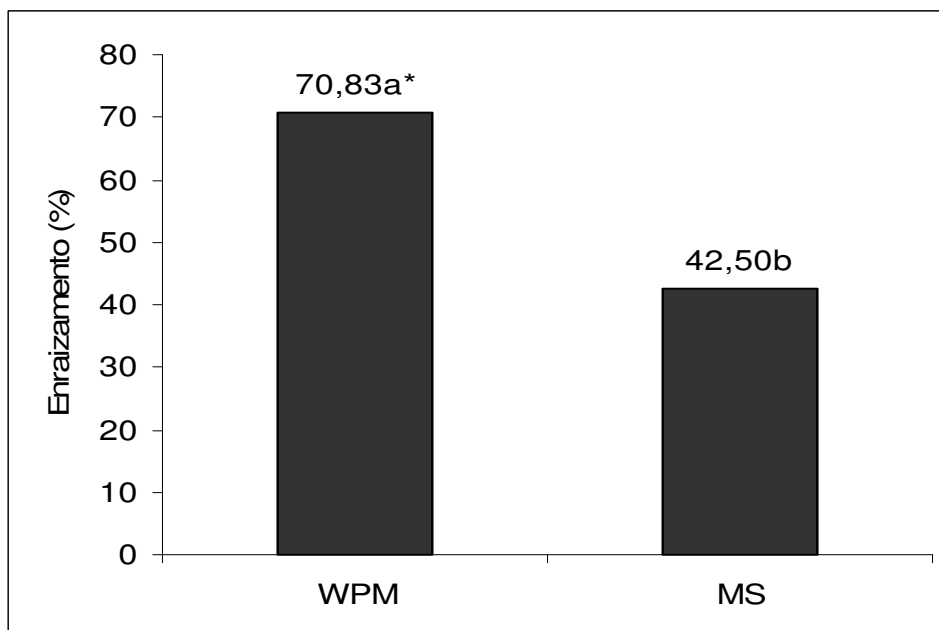


Figura 1 – Enraizamento de açoita-cavalo em dois meios de cultivo, WPM e MS. Santa Maria, RS, 2007.

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste F a 5% de probabilidade de erro.

Mantovani et al. (1999) verificaram a superioridade do meio WPM, na multiplicação de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dene. et Planch., quando comparado com o meio MS; Erig e Schuch (2005) também observaram que o meio WPM favoreceu o estabelecimento *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Flórida, com a adição de 24,6 μ M de Isopenteniladenina (2-iP) ao meio. Em estudos sobre a regeneração *in vitro* de *Cordia trichotoma* (louro-pardo), Mantovani et al. (2001) verificaram que a multiplicação da espécie foi favorecida quando a cultura se desenvolveu em meio WPM sem adição de reguladores de crescimento com este meio, proporcionando maior estímulo no desenvolvimento de gemas axilares, quando comparado ao meio MS. Provavelmente, o enraizamento de açoita-cavalo foi superior no meio WPM em relação ao meio MS, devido à baixa concentração iônica deste meio, o que contribuiu para o enraizamento (Figura 2). Entretanto, o meio MS também proporciona bons resultados como, por exemplo, na multiplicação de *Euterpe edulis* (GUERRA e HANDRO, 1991) e de macieira (*Malus domestica*) cv. Galaxy (ERIG et al., 2004).

Ápices caulinares e segmentos nodais são explantes muito utilizados no cultivo *in vitro* e para açoita-cavalo ambos demonstraram competência para o

estabelecimento da cultura. Segmentos nodais apresentaram eficiência no estabelecimento de diversas espécies lenhosas, tais como mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) (ERIG e SCHUCH, 2005), café (RIBEIRO et al., 2002), porta-enxerto de videira (*Vitis vinifera* 420-A (DZAZIO et al., 2002), porta-enxertos do gênero *Prunus* (SILVEIRA et al., 2001), macieira (*Malus domestica*) (ERIG et al., 2004), *Cordia trichotoma* (louro-pardo) (MANTOVANI et al., 2001).

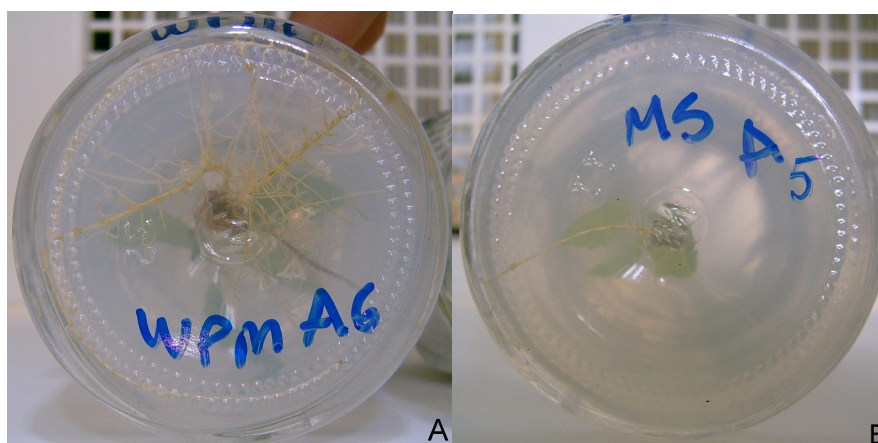


Figura 2 – Raízes em ápices caulinares de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini), cultivados em meio WPM (A) e MS (B). Santa Maria, RS, 2007.

Na Figura 3, é possível visualizar as diferentes respostas dos explantes, nos meios de cultivo WPM e MS, isso se deve à relação de “genótipo – dependência”, ou seja, cada genótipo responde de maneira única às condições as quais é submetido.

Os resultados obtidos demonstraram que o estabelecimento *in vitro* de açoita-cavalo pode ser efetuado, com sucesso, em ambos os meios testados empregando-se tanto ápices caulinares quanto segmentos nodais. Apesar disso, um ponto que deve ser considerado é a produtividade do trabalho, as plântulas utilizadas como fonte de explantes produzem um maior número de segmentos nodais (dois a três por plântula) comparadas aos ápices caulinares (um por plântula). Além disso, o meio WPM tem um custo mais baixo quando comparado ao MS, pois sua composição de sais é reduzida. Considerando o exposto, para maximizar o cultivo *in vitro* de açoita-cavalo sugere-se cultivar segmentos nodais em meio WPM.

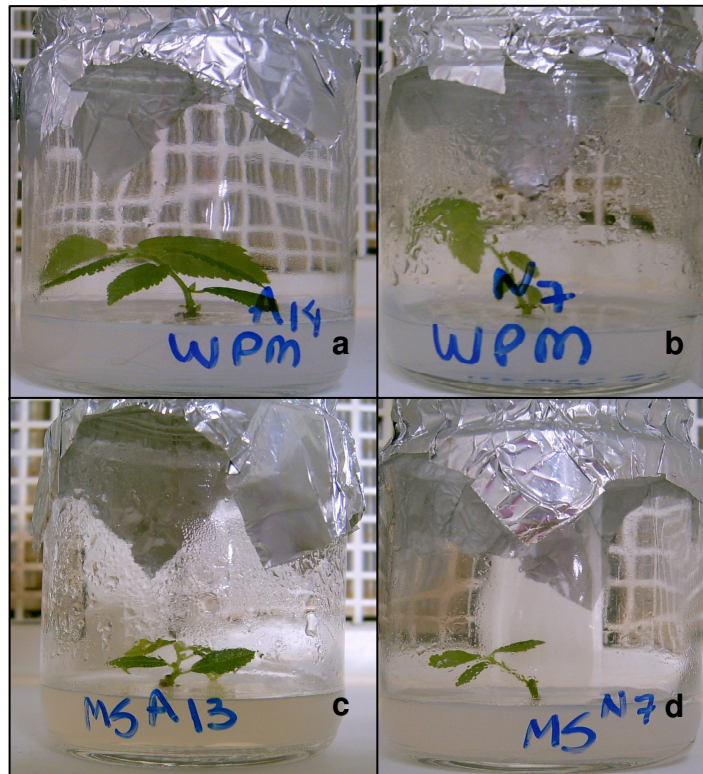


Figura 3 – Desenvolvimento de diferentes explantes em diferentes meios de cultivo, aos 60 dias de cultivo (a – ápice caulinar em meio WPM; b – segmento nodal em meio WPM; c – ápice caulinar em meio MS; d – segmento nodal em meio MS). Santa Maria, RS, 2007.

4.4 Conclusão

Para o estabelecimento *in vitro* de açoita-cavalo, pode-se empregar tanto ápices caulinares como segmentos nodais, independente do meio de cultivo WPM ou MS.

Para o enraizamento, o meio WPM foi mais eficiente, nos dois tipos de explantes, ápices caulinares e segmentos nodais.

5 CAPÍTULO III - EFEITO DA ORIENTAÇÃO DO EXPLANTE EM RELAÇÃO AO MEIO DE CULTURA

5.1 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência da orientação do explante no frasco no desenvolvimento *in vitro* de açoita-cavalo.

5.2 Materiais e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da UFSM, em Santa Maria, RS.

Os explantes, segmentos nodais, foram excisados de culturas obtidas a partir de sementes, os quais já estavam em seu segundo subcultivo. As sementes foram coletadas e armazenadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO /Florestas em Santa Maria, RS, em 2004.

Foi utilizado o meio base *Wood Plant Medium* – WPM (LLOYD e MCCOWN, 1981) (ANEXO A), sendo este acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado para 5,7. Posteriormente, os frascos foram autoclavados por 15 minutos à temperatura de 121 °C e 1 atm.

Os tratamentos consistiram em duas orientações dos explantes nos frascos: 90° e 45°. Os explantes foram inoculados sob condições assépticas em mesa de fluxo laminar e a unidade experimental (UE) foi composta por cinco frascos de vidro, com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio e um explante cada. Posteriormente, os frascos foram vedados com papel alumínio e dispostos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas de luz, 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

As avaliações foram realizadas aos 35 e 70 dias de cultivo, sendo observadas as variáveis número de folhas, número de nós e enraizamento (%).

As variáveis número de folhas e número de nós foram transformadas para raiz quadrada de $X + 0,5$, e enraizamento para raiz quadrada de $X + 0,5$, dividido por 100, sendo X o valor observado. Foram realizadas análises de variância, utilizando-se o programa estatístico *Statistica* (STASOFT, 1998).

5.3 Resultados e discussão

Não houve diferença significativa entre as orientações dos explantes em relação aos frascos para as variáveis analisadas. Em explantes posicionados a 45° observou-se 2,76 folhas e 2,20 nós; naqueles posicionados a 90°, 1,78 folhas e 1,43 nós. Ao longo dos 70 dias de cultivo ocorreu um acréscimo no número de folhas e número de nós (Figura 1). Erig e Schuch (2002) também verificaram não haver influência da orientação do explante, vertical ou horizontal, sobre o desenvolvimento de brotações, gemas e taxa de multiplicação em porta-enxerto de macieira (*Malus domestica*).

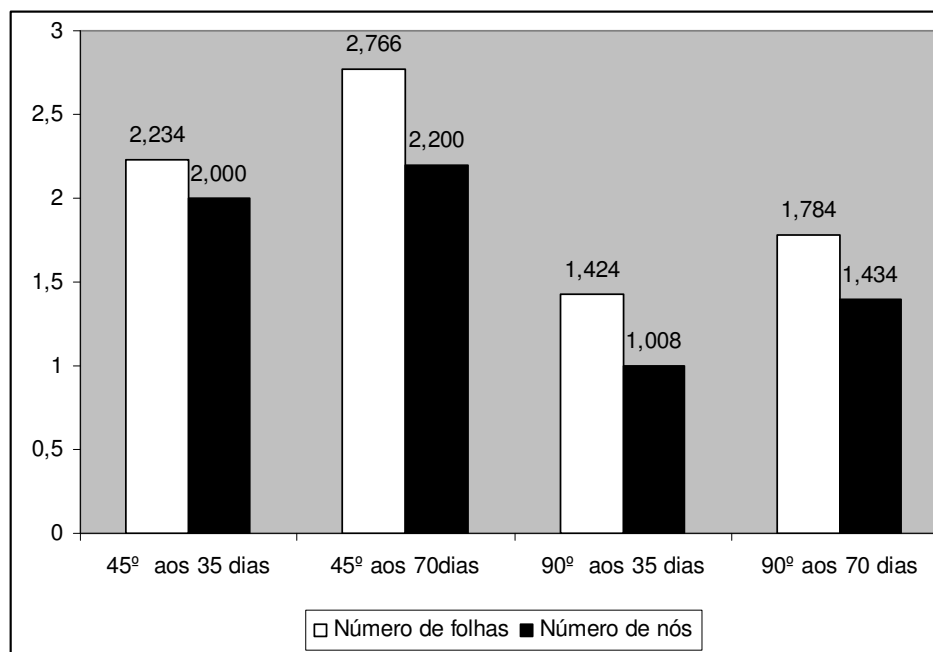


Figura 1 – Efeito da orientação dos explantes na formação de folhas e nós de *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini cultivados *in vitro*. Santa Maria, RS, 2007.

Para o enraizamento foi obtida a média de 38,33% com o explante a 45°, aos 70 dias de cultivo e a média de 6,66% com o explante a 90°, aos 70 dias, não havendo, contudo, diferença significativa entre os tratamentos. O reduzido percentual de enraizamento obtido pode ser atribuído à perda da capacidade rizogênica em explantes de açoita-cavalo após um subcultivo. Essa diminuição na capacidade de formar raízes, após o primeiro subcultivo, também foi observada em outro experimento com explantes dos tipos segmento nodal e ápice caulinar de açoita-cavalo.

Luis et al. (2006) observaram que a orientação dos explantes em relação ao frasco de cultivo não influencia na organogênese tanto direta quanto indireta de epicótilos de *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*, ratificando os resultados encontrados neste trabalho.

5.4 Conclusão

Não há influência da orientação do explante em relação meio de cultivo no desenvolvimento de culturas *in vitro* de açoita-cavalo.

6 CAPÍTULO IV - INFLUÊNCIA DA CITOCININA 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) NA MULTIPLICAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE AÇOITA-CAVALO *IN VITRO*

6.1 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência de diferentes concentrações da citocinina BAP na multiplicação de segmentos nodais de açoita-cavalo *in vitro*.

6.2 Material e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da UFSM, em Santa Maria, RS.

Os explantes testados foram excisados de plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro* com 40-50 dias de idade, as sementes foram coletadas e armazenadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro/Florestas em Santa Maria, RS, em 2005.

Foram testados três concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), sendo estas 5, 10 e 15 mg L⁻¹ e um tratamento testemunha (ausente de citocinina), associadas ao meio WPM (ANEXO A), sendo estes acrescidos de

30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,7. Posteriormente, os meios foram autoclavados por 15 minutos à temperatura de 121 °C e 1 atm.

Os explantes utilizados foram segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento, estes foram inoculados sob condições assépticas em mesa de fluxo laminar e a unidade experimental (UE) foi composta por quatro frascos de vidro, com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio e um explante cada. Posteriormente, os frascos foram vedados com papel alumínio e dispostos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas de luz, 20 µmol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 25 ± 2 °C, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

A avaliação foi realizada aos 35 dias de cultivo e as variáveis observadas foram sobrevivência, estabelecimento, número de brotações, número de nós, número de folhas, presença de calo e presença de raiz. A sobrevivência foi indicada pela coloração verde do explante e o estabelecimento, pela formação de novas gemas ou folhas.

As variáveis número de brotações, número de nós e número de folhas foram transformadas para raiz quadrada de X, sobrevivência, estabelecimento, presença de calo e presença de raiz foram transformadas para raiz quadrada de X + 0,5, sendo X o valor observado. Foram realizadas análises de variância e análises de regressão a 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico ESTAT (1994).

6.3 Resultados e discussão

As diferentes concentrações de BAP não influenciaram na sobrevivência, estabelecimento e presença de calos, estas variáveis não foram significativas (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito de diferentes concentrações de BAP na porcentagem de sobrevivência, no estabelecimento e na presença de calos em segmentos nodais de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini). Santa Maria, RS, 2007.

Concentrações de BAP (mg L⁻¹)	Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	Calos (%)
0	75a*	75a*	50a*
5	75a	75a	30a
10	85a	85a	60a
15	80a	80a	45a

* Médias não diferem significativamente entre si pelo teste F em nível de 5% de probabilidade de erro.

Também não houve efeito das diferentes concentrações de BAP sobre o número de folhas e brotações, as médias destas variáveis podem ser observadas na Tabela 2. Na ausência da citocinina BAP obteve-se a maior média de folhas bem como de brotações por explante, sendo estas de 3,65 e 1,25, respectivamente.

Villa et al. (2005) observaram um estímulo na produção de folhas de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Ébano, com o aumento na concentração da citocinina BAP, sendo que a maior média (7,89) foi observada com a dose de 1 mg L⁻¹. Mantovani et al. (2001), em estudos de micropropagação *in vitro* com *Cordia trichotoma* (louro-pardo), verificaram que BAP na concentração de 0,1 mg L⁻¹ associado a GA₃ promoveu uma maior multiplicação com 6,85 brotações por explante.

Mantovani et al. (1999) verificaram que o aumento da concentração de BAP proporcionou aumento nas respostas de indução de brotações, até a concentração de 1,0 mg L⁻¹, onde se obteve a maior taxa, 87,5%, de segmentos nodais com gemas axilares induzidas, formando brotações. Na concentração de 10 mg L⁻¹ este resultado diminuiu para 52,5%, nessa concentração as brotações formadas foram atípicas, com entrenós curtos e com folhas curvadas, espessas, quebradiças e de tamanho reduzido. Segundo Ziv (1991 apud MANTOVANI et al., 1999), estes sintomas são provocados por desordens fisiológicas, denominadas de vitrificação, que ocorrem em diversas

espécies quando cultivadas *in vitro* e são atribuídas, principalmente, ao excesso de citocininas no meio de cultura.

Não foram verificadas desordens fisiológicas no cultivo *in vitro* de açoita-cavalo, porém, as concentrações mais elevadas de BAP inibiram a indução de brotações e de folhas, provavelmente devido ao excesso desta citocinina adicionada ao meio de cultura WPM.

BAP na concentração de 2,0 mg L⁻¹ resultou em melhor indução de brotações originadas de segmentos nodais com média de 59,7%, na regeneração *in vitro* de espinheira-santa (FLORES et al., 1998).

Tabela 2 – Efeito de diferentes concentrações de BAP no número de folhas e brotações desenvolvidas em segmentos nodais de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini). Santa Maria, RS, 2007.

Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)	Número de folhas/ Explante	Número de brotações/ Explante
0	3,65a*	1,25a*
5	1,90a	0,80a
10	2,65a	1,20a
15	2,15a	1,00a

* Médias não diferem significativamente entre si pelo teste F em nível de 5% de probabilidade de erro.

Com o aumento da concentração de BAP o número de nós apresentou um crescimento que pode ser representado através de uma equação de terceiro grau (Figura 1).

O maior número de nós foi observado quando o cultivo de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Ébano foi realizado na ausência desta citocinina, isso pode ser atribuído ao fato de o regulador de crescimento BAP estimular a formação de maior número de brotos, porém, de tamanho reduzido, apresentando menor número de segmentos nodais e folhas (VILLA et al., 2005).

A maximização da proliferação de brotações pode ser atingida com o emprego de dois ou mais reguladores de crescimento (SKOOG e MILLER,

1957 apud SABÁ et al., 2002) e, provavelmente, a indução de brotações em açoita-cavalo necessita da combinação de citocininas e auxinas ou de concentrações baixas de citocinina.

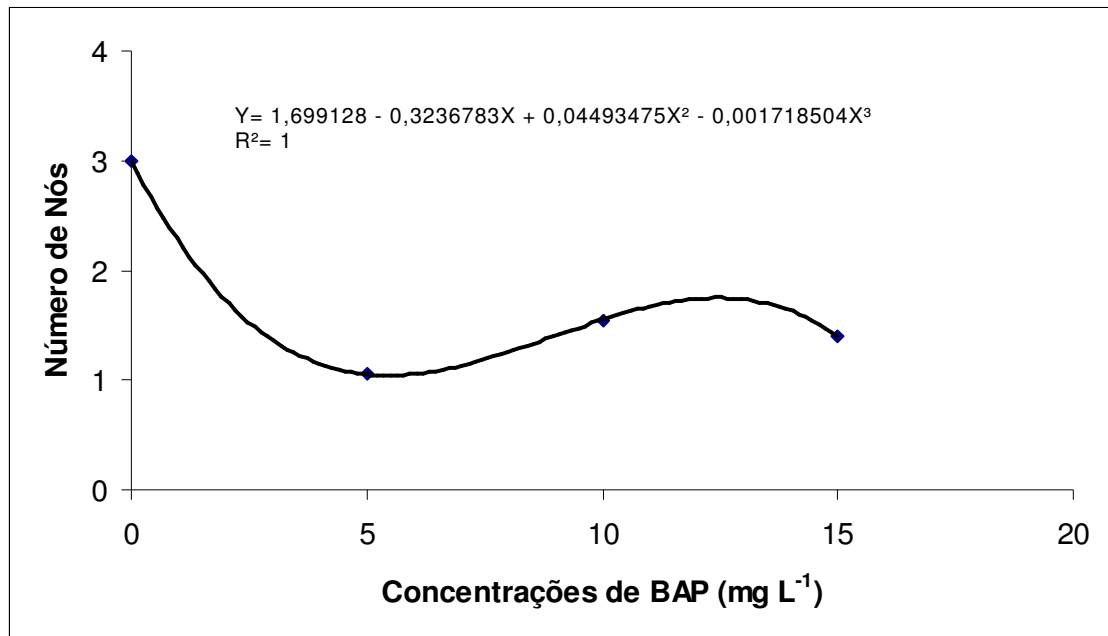


Figura 1 – Número de nós em segmentos nodais (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini), cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações de BAP. Santa Maria, RS, 2007.

Concentrações altas de citocininas promovem um maior crescimento da parte aérea (TORRES et al., 2001), portanto, as altas concentrações da citocinina BAP adicionadas ao meio podem ter inibido o enraizamento, fato que pode ser verificado na Figura 2.

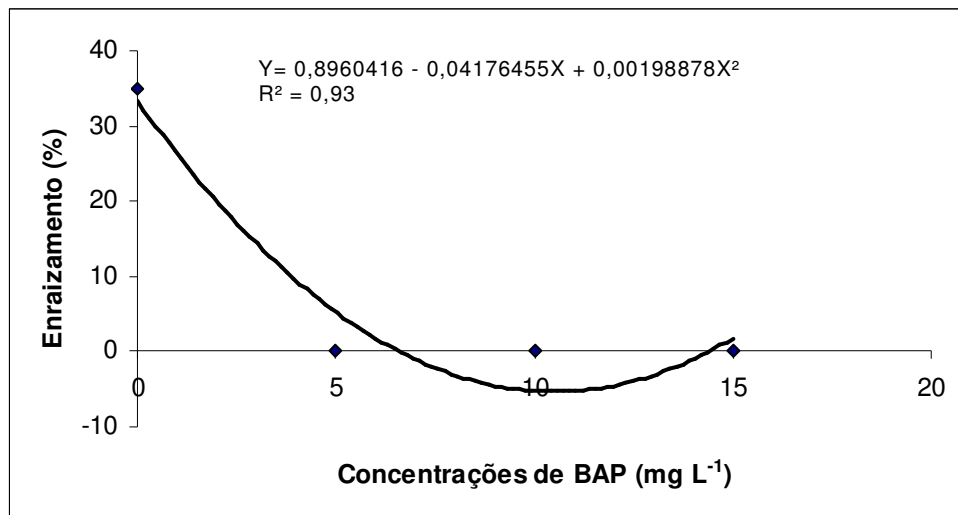


Figura 2 – Efeito da concentração de BAP no enraizamento de segmentos nodais de açoitá-cavalo (*Luehea divaricata* Martius et Zuccarini). Santa Maria, RS, 2007.

Na fase da multiplicação o enraizamento não é desejável, pois a planta utiliza suas reservas energéticas para desenvolver raízes ao invés de produzir novas brotações.

6.4 Conclusão

Nas concentrações testadas, a citocinina BAP inibiu a formação de brotações e folhas.

CONCLUSÕES GERAIS

A desinfestação superficial das sementes não foi alcançada com os tratamentos testados neste trabalho, porém a água quente demonstrou controlar parcialmente os microrganismos associados às sementes, e ainda auxiliou a germinação destas.

Para o estabelecimento *in vitro* os explantes ápices caulinares e segmentos nodais, independente dos meios MS e WPM apresentaram resultados satisfatórios.

A orientação do explante em relação ao meio de cultivo não influencia o desenvolvimento *in vitro*.

A citocinina BAP nas concentrações testadas demonstrou toxicidade, inibindo o desenvolvimento das plantas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Açoita-cavalo é uma espécie potencial para o cultivo *in vitro*. Os trabalhos realizados nesta dissertação contribuíram para elucidar algumas questões primárias da micropropagação da espécie.

Apesar de a desinfestação das sementes não ter sido totalmente eficiente nos experimentos realizados, plântulas oriundas de sementes se apresentaram como uma alternativa viável de fonte de explantes. Ápices caulinares e segmentos nodais apresentaram bom desenvolvimento, e a orientação dos explantes em relação ao meio de cultivo não demonstrou afetar o seu desenvolvimento e ainda, as altas concentrações de BAP inibiram a formação de novas brotações e folhas.

Novos estudos devem ser realizados com o intuito de desenvolver um protocolo eficiente de micropropagação, visando à clonagem e à conservação de germoplasma *in vitro*, tendo em vista que a espécie apresenta diversas qualidades e suas populações naturais foram reduzidas na natureza.

ANEXOS

ANEXO A – Tabela dos sais presentes nos meios de cultura Wood Plant Médium – WPM (Lloyd e McCown, 1981) e MS (Murashige e Skoog, 1962).

Concentração de sais		
Nutriente	WPM (g L ⁻¹)	MS (g L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	40	165
KNO ₃	0	190
CaCl ₂ . 2H ₂ O	9,6	44
MgSO ₄ . 7H ₂ O	37	37
KH ₂ PO ₄	17	17
MnSO ₄ . 4H ₂ O	1,69	1,69
H ₃ BO ₃	0,62	0,62
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,86	0,86
KI	0,083	0,083
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0,025	0,025
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0025	0,0025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,0025	0,0025
Na ₂ . EDTA . 2H ₂ O	3,73	3,73
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2,78	2,78
Tiamina . HCl	0,02	0,02
Ácido Nicotínico	0,1	0,1
Piridoxina	0,1	0,1
Ca(NO ₃) . 4H ₂ O	55,6	

APÊNDICES

APÊNDICE A – Teste de germinação de sementes de açoita-cavalo.

O teste foi realizado no Laboratório de Sementes, pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria.

Para a realização do teste de germinação a metodologia utilizada foi a do “*blotter test*”. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes cada, totalizando 200 sementes. As sementes foram acondicionadas em caixas tipo gerbox, contendo duas folhas de papel filtro, umedecidas com água destilada autoclavada. Após, foram submetidas a condições controladas em câmara com fotoperíodo de 12 horas de luz e temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 2$, por um período de 28 dias. A primeira avaliação ocorreu aos sete dias e a segunda avaliação, aos 28 dias. As variáveis analisadas foram sementes germinadas e sementes podres para os dois lotes de sementes intitulados 2004 e 2005. Os dados de contagem foram transformados para porcentagem.

O lote de 2004 apresentou 26,5% de germinação e o lote de 2005 apresentou uma taxa de 27% de germinação. Quanto às sementes podres, no lote de 2004 observaram-se 45,5% e no de 2005, 16%.

APÊNDICE B – Teste de sanidade em sementes de açaite-cavalo.

O teste foi realizado no Laboratório de Fitopatologia, pertencente ao Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria.

Para verificação da sanidade das sementes foram utilizadas 200 sementes, subdivididas em quatro repetições de 50 sementes cada. As sementes foram colocadas em caixas tipo gerbox contendo duas folhas de papel filtro umedecidas com água destilada autoclavada e após, acondicionadas em câmara com fotoperíodo de 12 horas de luz e temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, por um período de sete dias. A análise da sanidade foi realizada com o auxílio de microscópio estereoscópico, sendo que, quando necessário, foram feitas lâminas as quais eram observadas no microscópio óptico, para a identificação do gênero fúngico e, na seqüência, determinação da porcentagem de incidência de cada um. As bactérias foram observadas visualmente e apenas contadas, não sendo identificadas em nível de gênero.

Para o lote de 2004, os gêneros de fungos identificados foram *Curvularia* sp. (5%), *Rhizopus* sp. (11%), *Fusarium* sp. (24,5%), *Penicillium* sp. (7,5%) e *Aspergillus* sp. (6,5%). As bactérias apareceram em 25% das sementes.

Para o lote de 2005, os gêneros de fungos identificados foram *Fusarium* sp. (41%), *Alternaria* sp. (27,5%) e *Aspergillus* sp. (1%). As bactérias apareceram em 7,5% das sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDRADE, M.W. de; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S.; MELO, P.R.A. de. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência Agrotécnica**, v. 24, n. 1, p. 174-180, jan./mar., 2000.

ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.2. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 262-297.

AZEVEDO, M.A.M.de; VALENTE, M.C. Tiliaceae da mata de encosta do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e arredores, Rio de Janeiro, RJ. **Arquivos do Museu Nacional**. Rio de Janeiro, v. 63, n. 4, p. 631-637, out./dez., 2005.

BARROSO, G.M.; GUIMARÃES, E.F.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; PEIXOTO, A.L. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. São Paulo: USP, 1978. v. 1.

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

BIANCHI, V.J.; CHAVES, A.C.; SCHUCH, M.W.; FACHINELLO, J.C. Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro: efeito do tipo de explante e tempo de imersão em hipoclorito de sódio. **Rev. Brasileira Agrociência**, v. 9, n. 2, p. 177-179, abr./jun., 2003.

BORGATTO, F.; HAYASHI, T.K. Biotecnologia de plantas. In: CASTRO, P.R.C.; SENA, J.O.A. de; KLUGE, R.A. (org.). **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá, PR: Eduem, 2002. p. 227-254.

BRENA, D.A. Proposição de um sistema de inventário florestal nacional para o Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 6, p. 109-127, 1996.

BRUM, G.R. **Micropropagação de figueira (*Ficus carica* L.) ‘Roxo de Valinhos’**. 2001. 41f. Dissertação (Mestrado em Fitoquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2001.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e usos da madeira**. Colombo, PR: EMBRAPA – CNPF, 1994. 640p.

CID, L.P.B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? Cultura de tecidos vegetais – uma ferramenta no estudo da biologia moderna de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/>>. Acesso em: jun. de 2006.

CHAVES, A.C.; SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, MG, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, nov./dez., 2005.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: New York Botanical Garden, 1988. 555p.

DAMIÃO FILHO, C.F. **Cultura de tecidos de plantas: micropropagação**. Jaboticabal, SP: FUNEP, 1995. 25p.

DECCETTI, S.F.C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2000.

DURZAN, D.J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 6, p. 341-378, 1988.

DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira “420 A”. **Rev. Bras. de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 759-764, dez., 2002.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W.; SILVA, L.C. da. Multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cv. Galaxy: meio de cultura e agentes solidificantes alternativos. **Rev. Bras. de Agrociência**, v. 10, n. 3, p. 297-302, jul./set., 2004.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de Macieira cv. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Rev. Bras. Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 24, n. 2, p. 293-295, ago., 2002.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de sementes nodais. **Scientia Agraria**, v. 6, n. 1-2, p. 91-96, 2005.

ESTAT – 2.0. **Sistema de Análise Estatística**. Jaboticabal: Pólo Computacional – Departamento de Ciências Exatas – Unesp, 1994.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E.T.H.; MANTOVANI, N. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 4, n. 3, p. 201-205, set./dez., 1998.

FRANCO, E.T.H.; FERREIRA, A.G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2002.

GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Euterpe edulis* Mart (Palmae). In: ARAUJO, R. (ed) **Woody Plant Biotechnology**. New York: Plenum Press, 1991. p. 189-196.

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

HARTNEY, V.J. Vegetative propagation of Eucalyptus. **Australian Forestry Research**, v. 10, p. 191-211, 1979.

HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, p. 533-568, 1998.

KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (eds) **Manual de Fitopatologia**, v.1, 3ª ed.- São Paulo, Agronômica Ceres, 1995. p. 761-785.

KIRST, M.; SEPEL, L.M.N. Micropropagação de *Cedrela fissilis* Vellozo a partir de ápices de plântulas. In: I SIMPÓSIO SOBRE ECOSSISTEMAS NATURAIS

DO MERCOSUL. 1996, Santa Maria. **Anais...** p.119-126. Santa Maria, RS, 1996a.

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

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

LORENZI, H. Árvores Brasileiras. **Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. 4. ed. São Paulo: Odessa/Instituto Plantarum, 2002. 368 p. v. 1.

LUIS, A.G; MOLINA, R.V.; VARONA, V.; CASTELLÓ, S.; GUARDIOLA, J.L. The influence of explant orientation and contact with the medium on the pathway of shoot regeneration *in vitro* in epicotyl cuttings of Troyer citrange. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 85:134-44, 2006.

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; McKEE, R.A. **Uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344p.

MANTOVANI, N.C. Cultura de tecidos de plantas lenhosas. **Série técnica**. Santa Maria, RS: UFSM/CEPEF/FATEC, 1998. 123 p.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; GUERRA, M.P.; HOPPE, J.M. Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et. Planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 9, n. 1, p. 47-61, 1999.

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

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

MEDEIROS, J.D. A biotecnologia e a extinção de espécies. **Rev. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p.109-113, jan./jun., 2003.

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n. 36 e 37, p. 5-10, 2000.

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

PARANJOTHY, K.; SAXENAIS, S.; BANERJEE, M.; JAIWAL, V.S.; BHOJWANI, S. S. Clonal multiplication of woody perennials. In: BHOJWANI, S. S. (ed) **Plant tissue culture: applications and limitations**. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Company, 1990. p. 190-219.

PEREIRA, J.E.S.; CITADIN, I.; PETERS, J.A. Efeito de diferentes meios de cultura na regeneração *in vitro* do meloeiro (*Cucumis melo* L.) “gaúcho” e “hales best imperial”. **Ciência Agrotécnica**, v. 23, n. 3, p. 540-546, jul./set., 1999.

PUGA, N.T.; NASS, L.L.; AZEVEDO, J.L. **Glossário de biotecnologia vegetal**. São Paulo: Manole, 1991. 87p.

RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M.P. Micropropagação de *Aspidosperma lolyneuron* (Peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Rev. Árvore**, v. 29, n. 4, p. 517-524, 2005.

RIBEIRO, L.S.; PASQUAL, M.; MARCIEL, A.L.R.; ARANTES, E.S.; CHAGAS, E.A. Fontes de nitrogênio na micropropagação de *Coffea arábica*. **Scientia Agraria**, v. 3, n. 1-2, p. 107-112, 2002.

RICHTER, H.G.; DALLWITZ, M.J. Disponível em: <[http://delta-intkey.com/wood/pt/www/tilludiv .htm](http://delta-intkey.com/wood/pt/www/tilludiv.htm)> Acesso em: out. de 2006.

SABÁ, R.T.; LAMEIRA, O.A.; LUZ, J.M.Q.; GOMES, A.P. do R.; INNECCO, R. Micropropagação de jaborandi. **Hortic. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 106-109, março, 2002.

SELING, I.; SPATHELF, P. Benefícios indiretos da floresta. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 9, n. 2, p. 137-146, 1999.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba, RS: Agropecuária, 2001. 463 p.

SILVEIRA, C.A.P.; FACHINELLO, J.C.; FORTES, G.R.L.; CITADIN, I.; RODRIGUES, A.C.; QUEZADA, A.C.; SILVA, J.B. da. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura. **Rev. Bras. de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 488-492, dez., 2001.

SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152 p.

STATSOFT. **Statistica for Windows** (Computer Program Manual). Tulsa: Statsoft, 1998.

TANAKA, J.C.A.; SILVA, C.C.; DIAS FILHO, B.P. et al. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Quím. Nova**, v. 28, n. 5, p. 834-837, 2005.

TAVARES, L.F.S.; MAGALHÃES JR., A.M.; PETERS, J.A. Organogênese indireta de explantes de arroz da região meristemática de ápices caulinares. **Rev. Bras. Agrotécnica**, v. 10, n. 2, p. 203-207, abr./jun., 2004.

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

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

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/SPI/Embrapa/CNPH, 1998. v. 2. 854 p.

TORRES, A.C. et al. Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas. **Circular técnica**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/EMBRAPA Hortaliças, n. 24, p. 20, dez., 2001.

VASIL, I.K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and group crops. **Journal of Plant Physiology**. Stuttgart, v. 128, p. 193-218, 1987.

VIEITEZ, A.M.; PINTOS, F.; SAN JOSE, M.C.; BALLESTER, A. *In vitro* shoot proliferation determined by explant orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L. **Tree Physiology**, Victoria, v.12, n.2, p.107-117, 1993.

VILLA, F.; ARAÚJO, A.G. de.; PIO, L.A.S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência Agrotécnica**, v. 29, n. 3, p. 582-589, maio/jun., 2005.

YAE, B.W.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I.; KO, K.C. Influence of photoperiod, apical meristem, and explant orientation on axillary shoot proliferation of apple cultivars *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, p. 588-592, 1987.