

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

**GERMINAÇÃO, ESTABELECIMENTO,
REGENERAÇÃO E CALOGÊNESE *IN VITRO*
EM EXPLANTES DE AÇOITA-CAVALO
(*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Enrique Asterio Benítez León

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**GERMINAÇÃO, ESTABELECIMENTO,
REGENERAÇÃO E CALOGÊNESE *IN VITRO* EM EXPLANTES
DE AÇOITA-CAVALO (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.)**

por

Enrique Asterio Benítez León

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

2010

L579g

León, Enrique Asterio Benitez, 1978-

Germinação, estabelecimento, regeneração e calogênese *in vitro* em explantes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) / Enrique Asterio Benitez León. - 2010.
59 f.; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2010.

“Orientadora: Prof^a. Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger”

1. Engenharia florestal 2. Açoita-cavalo 3. Cultura de tecidos 4. Bicloreto de mercúrio 5. Fungicidas 6. Fitorregulares I. Reiniger, Lia Rejane Silveira II. Título

CDU: 630*23

Ficha catalográfica elaborada por
Patrícia da Rosa Corrêa – CRB 10/1652
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

© 2010

Todos os direitos autorais reservados a Enrique Asterio Benítez León. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser com autorização por escrito do autor.

Endereço: Av. Roraima 1000. Centro de Ciências Rurais. Departamento de Fitotecnia, Predio 77, sala 36. CEP. 97105-900. Santa Maria, RS.

End. Eletr.: ebenitezleon@yahoo.com

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

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

**GERMINAÇÃO, ESTABELECIMENTO,
REGENERAÇÃO E CALOGÊNESE *IN VITRO* EM EXPLANTES
DE AÇOITA-CAVALO (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.)**

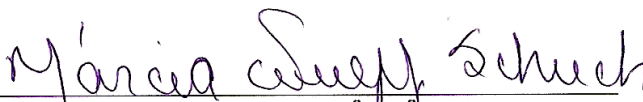
Elaborada por
Enrique Asterio Benítez León

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

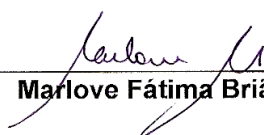
COMISSÃO EXAMINADORA



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



Márcia Wulff Schuch, Prof^a. Dr^a. – UFPEL



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

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2010.

Um dia você aprende que...

“O que importa não é o que você tem na vida,
mas quem você é na vida

E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher...”

William Shakespeare

Aos meus pais, Gilberto e Cornelia,
pelo amor e exemplo de vida...

A minha irmã Griselda,
pelo amor e dedicação...

Ofereço...

Ao meu filho, Diego Enrique
Com amor...

Dedico...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fortaleza para superar os momentos difíceis e pela saúde durante todo o tempo.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, por oferecerem a estrutura e os recursos necessários para o desenvolvimento do mestrado.

A Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, pelo apoio proporcionado para a realização do curso de mestrado.

Ao CNPq, por meio do Programa de Estudante Convênio de Pós- Graduação (PEC-PG), pelo apoio financeiro para a realização do curso.

A minha Orientadora Lia Rejane Silveira Reiniger, pela orientação, pelo apoio, ensinamentos, atenção e amizade, fatores fundamentais para o bom desenvolvimento do curso.

Ao meu colega e amigo Diego Pascoal Golle, pelo apoio constante, sugestões e dicas compartilhadas durante o desenvolvimento dos trabalhos.

Aos demais colegas de Laboratório, Aline Curti, Daniel Waldow, Márcio Navroski, Felipe Corrêa, Caroline Bevilacqua, pela ajuda, amizade e apoio constante.

Ao pessoal do Laboratório de Fitopatologia, Maria e professora Marlove, por facilitarem os materiais e as condições para realização dos testes de qualidade fisiológica e sanitária das sementes.

Aos meus colegas de casa, Gerônimo, Fernando e Thiago, pela amizade e parceria de todos os dias. Valeu!

Aos meus compatriotas, Nathalia e Marcos, pelos bons momentos compartilhados.

A querida Juliana, pelo carinho, apoio e sugestões proporcionados.

A família Kanieski, pelo recebimento e o calor de lar que sempre ofereceram para mim, muito obrigado.

A todos os amigos que ganhei durante a minha estada em Santa Maria, muito obrigado pelos momentos de amizade e parceria.

Finalmente, agradeço a todas as pessoas que, de uma ou outra forma, contribuíram para a finalização do curso de mestrado.

Gracias a todos!!!

RESUMO

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

GERMINAÇÃO, ESTABELECIMENTO, REGENERAÇÃO E CALOGÊNESE *IN VITRO* EM EXPLANTES DE AÇOITA-CAVALO (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.)

AUTOR: ENRIQUE ASTERIO BENÍTEZ LEÓN

ORIENTADORA: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2010

O avanço da biotecnologia na área florestal tem favorecido as técnicas de propagação *in vitro* de espécies que apresentam dificuldades na reprodução via sementes. *Luehea divaricata* Mart. & Zucc (açoita-cavalo), integrante da família Malvaceae, é uma espécie florestal que sofreu, nas últimas décadas, grande redução das áreas ocupadas por populações naturais, em função do interesse de seu uso na fabricação de móveis vergados. Adicionalmente, apresenta germinação lenta e irregular e a viabilidade das sementes é muito desuniforme, características que contribuem para uma reduzida capacidade de recuperação natural das populações. Considerando-se a potencialidade da aplicação de técnicas de cultura de tecidos na propagação massal dessa espécie, o presente trabalho teve como objetivos: desenvolver uma metodologia que promova uma eficiente desinfestação superficial de sementes, visando à germinação *in vitro*; avaliar a capacidade de dois tipos de explantes de origem seminal em realizar o estabelecimento *in vitro*; avaliar a regeneração de segmentos uninodais isolados de plantas oriundas da germinação *in vitro* em função da adição da citocinina BAP e da auxina ANA, em diferentes concentrações, ao meio nutritivo WPM; e, por fim, analisar as respostas calogênicas de fragmentos foliares, face às diferentes concentrações de BAP e ANA em meio nutritivo WPM. Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos, do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento da Universidade Federal de Santa Maria. Foram utilizadas sementes coletadas pela Fepagro/Florestas e, as plantas obtidas, foram utilizadas como fonte de explantes para os experimentos de cultura de tecidos. Foram testados o efeito de diferentes concentrações e de tempos de imersão das sementes em bicloreto de mercúrio, e, também, a influência de fungicidas Dicarboximida e Benzimidazol na desinfestação superficial. Para o estabelecimento *in vitro*, foram avaliados segmentos nodais e apicais caulinares isolados de plantas, após 60 dias de cultivo *in vitro*. A desinfestação superficial das sementes de açoita-cavalo com bicloreto de mercúrio foi eficiente, promovendo uma germinação satisfatória e ausência de fitotoxicidade. Por outro lado, o uso de fungicidas, após procedimento de desinfestação com bicloreto de mercúrio, além de apresentar efeito tóxico para as plantas, não controlaram a contaminação por microrganismos. O estabelecimento *in vitro* de açoita-cavalo foi efetuado com sucesso, tanto a partir de segmentos apicais, como segmentos nodais, com destaque para estes pelo maior desenvolvimento foliar. As concentrações de BAP e ANA testadas, não resultam em um balanço hormonal adequado à promoção de respostas otimizadas na multiplicação *in vitro* de açoita-cavalo, a partir do cultivo de segmentos nodais; a presença de BAP influencia, significativamente, a calogênese, ao contrário de ANA, que não afeta a formação de calos em fragmentos foliares de açoita-cavalo. Estudos adicionais devem ser realizados no sentido de otimizar a desinfestação superficial, a multiplicação e a calogênese *in vitro*, permitindo a obtenção de um número maior de culturas assépticas para dar continuidade a outras etapas da cultura de tecidos. Finalmente, os estudos que visam contribuir para a micropropagação em açoita-cavalo devem prosseguir, já que a espécie apresenta entraves para a propagação por sementes que podem ser superados pela cultura de tecidos.

Palavras-chave: cultura de tecidos, bicloreto de mercúrio, fungicidas, fitorreguladores, auxina, citocinina

ABSTRACT

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

IN VITRO GERMINATION, ESTABLISHMENT, REGENERATION AND CALLI INDUCTION IN EXPLANTS OF AÇOITA-CAVALO (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.)

AUTHOR: ENRIQUE ASTERIO BENÍTEZ LEÓN

ADVISOR: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Date and Place of Defense: Santa Maria, February, 26, 2010

The advance of biotechnology in forestry has favored techniques of *in vitro* propagation of species that present difficulties in reproduction by sexual seeds. *Luehea divaricata* Mart. & Zucc, a member of the Malvaceae family, is a species that has suffered in recent decades, a large reduction in the areas occupied by natural populations, because of its use in the manufacture of furniture. Additionally, it presents slow and irregular germination and seed viability is very uneven, characteristics that contribute to a reduced ability to recover natural populations. Considering the potential for the application of techniques of tissue culture in the mass propagation of this species, this study aimed to: develop a methodology to promote an efficient surface disinfection of seed germination in order to *in vitro* evaluate the ability of two types of explants of seminal in performing the *in vitro* establishment; evaluate the nodal segments isolated from plants grown *in vitro* germination depending on the addition of BAP and NAA in different concentrations, in the WPM nutrient medium, and, finally, analyze the calli seedlings responses of leaf fragments to different concentrations of BAP and NAA in WPM. The project was developed at the Laboratory of Tissue Culture at the Center for Biotechnology and Breeding of the Federal University of Santa Maria. The seeds used were collected by Fepagro/Forests and the plants obtained were used as source of explants for the experiments in tissue culture. We tested the effect of different concentrations and immersion times of seeds in mercuric chloride, and also the influence of fungicides Dicarboximida and Benzimidazole in the surface disinfections. To *in vitro* establish were evaluated apical and nodal segments isolated from plants after 60 days *in vitro* culture. The surface disinfection of *L. divaricata* seeds with mercuric chloride was efficient, promoting a satisfactory germination and lack of phytotoxicity. Moreover, the use of fungicides, after disinfection procedure with mercuric chloride, showed toxic effect on plants, failed to control contamination by microorganisms. The *L. divaricata in vitro* establishment was successful from both the apical and nodal segments, especially those that result in higher leaf development. Concentrations of BAP and NAA tested don't result in a hormonal balance appropriate to promote optimal responses *in vitro* multiplication of *L. divaricata* from the culture of nodes segments and the presence of BAP influence significantly the calli induction, unlike NAA which don't affect the calli formation on leaf fragments. Further studies should be performed to optimize the *in vitro* surface disinfection, multiplication and callus induction capable of producing a larger number of aseptic cultures to continue to other steps in tissue culture. Finally, studies that aim to contribute to the *L. divaricata* micropropagation should continue, since the species presents barriers to the spread by seeds that can be overcome by tissue culture.

Key Words: tissue culture, mercuric chloride, fungicides, growth regulators, auxin, cytokinin

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Sementes de <i>Luehea divaricata</i> (Mart. & Zucc.) aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> , após serem submetidas à imersão em bicloreto de mercúrio (HgCl_2) a diferentes concentrações, apresentando contaminação bacteriana (a) e contaminação fúngica (b). UFSM, Santa Maria, RS, 2010.....	31
FIGURA 2 –	Plantas de <i>Luehea divaricata</i> (Mart. & Zucc.) germinadas <i>in vitro</i> com 40 dias de idade, após tratamentos de desinfestação com diferentes concentrações de bicloreto de mercúrio (HgCl_2). UFSM, Santa Maria, RS, 2010.....	33
FIGURA 3 –	Parte aérea e sistema radicular de plantas de <i>Luehea divaricata</i> (Mart. & Zucc.) obtidas a partir de explantes de origem seminal, com 60 dias de idade, após tratamento de desinfestação com diferentes concentrações de bicloreto de mercúrio (HgCl_2). UFSM, Santa Maria, RS, 2010.....	34
FIGURA 4 –	Aspecto geral do sistema radicular de plantas de <i>Luehea divaricata</i> (Mart. & Zucc) obtidas a partir de explantes de origem seminal, com 60 dias de idade, após o tratamento de desinfestação com diferentes concentrações de bicloreto de mercúrio (HgCl_2). UFSM, Santa Maria, RS, 2010.....	35
FIGURA 5 –	Porcentagem de sobrevivência, aos 45 dias de cultivo, de segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> (Mart. & Zucc.) cultivados <i>in vitro</i> , em meio WPM com diferentes níveis de concentração de BAP. UFSM, Santa Maria, RS, 2010.....	44
FIGURA 6 –	Segmentos nodais de <i>Luehea divaricata</i> (Mart.& Zucc.) <i>in vitro</i> , com formação de novos brotos e folhas (a) e formação de brotos com calo na base (b), em diferentes níveis de concentração de BAP. UFSM, Santa Maria, RS, 2010.....	45
FIGURA 7 –	Notas atribuídas à formação de calos em fragmentos foliares de <i>Luehea divaricata</i> (Mart. & Zucc.) cultivados <i>in vitro</i> , em meio WPM com diferentes concentrações de BAP, aos 45 dias de cultivo. UFSM, Santa Maria, RS, 2010.....	47
FIGURA 8 –	Explantes foliares de <i>Luehea divaricata</i> (Mart. & Zucc.) <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de BAP: explante oxidado e/ou contaminado (0); explante sem alterações morfológicas (1); explantes com bordas onduladas (2); explante com formação de pequenos calos (3); explante com calos totalmente formados (4). UFSM, Santa Maria, RS, 2010.....	48

FIGURA 9 – Calos formados (%) em fragmentos foliares de <i>Luehea divaricata</i> (Mart. & Zucc.) cultivados <i>in vitro</i> , em meio WPM com diferentes concentrações de BAP, aos 45 dias de cultivo. UFSM, Santa Maria, RS, 2010.....	49
FIGURA 10 – Número médio de calos formados em fragmentos foliares de <i>Luehea divaricata</i> (Mart. & Zucc.) cultivados <i>in vitro</i> , em meio WPM com diferentes concentrações de BAP, aos 45 dias de cultivo. UFSM, Santa Maria, RS, 2010.....	50

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Tabela dos sais presentes no meio de cultivo Woddy Plant Medium – WPM (Lloyd e Mc Cown, 1981).....	59
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
	2.1 Objetivo geral.....	15
	2.2 Objetivos específicos.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
	3.1 <i>Luehea divaricata</i> (Mart. & Zucc).....	16
	3.1.1 Aspectos da propagação de açoita-cavalo.....	17
	3.2 Cultura de tecidos e propagação <i>in vitro</i> de espécies lenhosas.....	18
	3.2.1 Micropropagação, fitorreguladores e calogênese <i>in vitro</i>	19
	3.2.2 Explantes e desinfestação superficial na cultura de tecidos.....	23
4	CAPITULO I – GERMINAÇÃO ASSÉPTICA DE SEMENTES E ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE EXPLANTES DE AÇOITA-CAVALO...	25
	4.1 Material e métodos.....	25
	I - Germinação asséptica de sementes de açoita-cavalo, empregando-se desinfestação superficial com bicloreto de mercúrio (HgCl ₂).....	26
	II - Germinação asséptica de sementes de açoita-cavalo, empregando-se desinfestação superficial com fungicidas.....	27
	III - Sobrevivência e estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes de açoita-cavalo..	29
	4.2 Resultados e discussão.....	30
	I - Germinação asséptica de sementes de açoita-cavalo, empregando-se desinfestação superficial com bicloreto de mercúrio (HgCl ₂).....	30
	II - Germinação asséptica de sementes de açoita-cavalo, empregando-se desinfestação superficial com fungicidas.....	36
	III - Sobrevivência e estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes de açoita-cavalo..	38
	4.3 Conclusões.....	40
5	CAPITULO II. REGENERAÇÃO E CALOGÊNESE <i>IN VITRO</i> EM AÇOITA-CAVALO COM A UTILIZAÇÃO DE FITORREGULADORES.....	41
	5.1 Material e métodos.....	41
	I - Regeneração <i>in vitro</i> de segmentos nodais com o emprego de diferentes concentrações de fitorreguladores.....	41
	II – Calogênese, a partir de fragmentos foliares de açoita-cavalo.....	42
	5.2 Resultados e discussão.....	43
	I - Regeneração <i>in vitro</i> de segmentos nodais com o emprego de diferentes concentrações de fitorreguladores.....	43
	II - Calogênese a partir de fragmentos foliares de açoita-cavalo.....	47

5.3 Conclusões.....	50
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXOS.....	59

1 INTRODUÇÃO

Vem sendo, cada vez mais, estudadas a identificação das potencialidades e a possibilidade de utilização da flora nativa, especialmente, com o intuito de propiciar o emprego de espécies florestais adaptadas ao ambiente. Há algum tempo, porém, concomitantemente, vem aumentando a preocupação em torno da produção sustentável, de maneira a não prejudicar a ocorrência natural dos recursos florestais. Para atingir esses propósitos, são necessários estudos que permitam conhecer melhor as características das essências nativas, viabilizando-se a oferta de mudas de alta qualidade.

A cultura de tecidos em espécies lenhosas vem recebendo grande impulso nas últimas décadas, sendo sua utilização, rotineira, em muitas empresas do ramo florestal, demonstrando ser uma ferramenta tecnológica viável para a produção de mudas de alto padrão genético, fisiológico e sanitário. Nesse sentido, a propagação vegetativa *in vitro* tem-se destacado, nos últimos anos, como tecnologia adequada à implantação de florestas clonais, substituindo-se as práticas convencionais por técnicas que passaram a garantir a superioridade genética dos indivíduos (BASSAN, 2006).

As plantas obtidas através da técnica de cultura de tecidos são consideradas geneticamente idênticas às plantas doadoras de material vegetal ou plantas mãe, característica que pode ser aproveitada para executar programas de conservação de recursos florestais. A conservação *in vitro*, de espécies vegetais, é outra grande potencialidade da cultura de tecidos, sendo, normalmente, estabelecida, a partir da germinação de sementes, desenvolvimento de tecidos e cultura de gemas e embriões, mantidos por tempo indeterminado sob condições assépticas e de crescimento lento.

Luehea divaricata Mart. & Zucc., 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 detentora de alto valor silvicultural.

Esta espécie, assim como tantas outras, teve suas populações naturais devastadas pela ação antrópica e, apesar de não estar na lista oficial de espécies em vias de extinção, a propagação *in vitro* de açoita-cavalo é de suma importância, garantindo, assim, a preservação dos genes, que constituirão a base para o melhoramento genético, auxiliado pela biotecnologia.

A partir de estudos efetuados, visando ao desenvolvimento de técnicas que permitem a propagação vegetativa de espécies florestais exóticas de rápido crescimento, a micropropagação de genótipos promissores vem possibilitando um considerável avanço na silvicultura no Brasil, podendo-se estender para as espécies nativas de interesse comercial e ecológico.

A micropropagação, uma das técnicas de cultura de tecidos, pode ser empregada na produção de mudas de açoita-cavalo de alta qualidade, em grande escala, com a finalidade de obter plantas sadias para a formação de populações e/ou para a recuperação de matas degradadas. Para tanto, devem ser realizados estudos com o intuito de desenvolver metodologias eficientes de micropropagação para açoita cavalo, visando a clonagem e a conservação de germoplasma *in vitro*, tendo em vista que a espécie apresenta diversas qualidades e suas populações naturais estão reduzidas na natureza (FLÔRES, 2007).

Além disso, o interesse por espécies nativas, contudo, não se deve restringir apenas aos benefícios advindos da cultura de tecidos na propagação clonal em larga escala, a fim de instalar plantios comerciais altamente produtivos, mas também, como uma forma alternativa e eficiente para a conservação destas espécies (MANTOVANI, 1997).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Contribuir para os esforços relacionados à exploração sustentável de espécies florestais nativas, a partir do estudo da propagação *in vitro* de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.).

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver uma metodologia para a desinfestação superficial de explantes de açoita-cavalo, visando à sua germinação *in vitro*;
- Avaliar a capacidade e a eficiência de segmentos apicais caulinares e segmentos nodais de origem seminal como explantes, para o estabelecimento *in vitro* de açoita-cavalo;
- Avaliar a regeneração de segmentos nodais isolados de plantas oriundas da germinação *in vitro*, em função da adição da citocinina 6-Benzilaminopurina (BAP) e da auxina ácido naftaleno acético (ANA), em diferentes concentrações, ao meio nutritivo *Woody Plant Medium* (WPM);
- Analisar as respostas calogênicas de fragmentos foliares isolados de plantas oriundas da germinação *in vitro*, face às diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA) em meio nutritivo *Woody Plant Medium* (WPM).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Luehea divaricata* (Mart. & Zucc.)

Integrante da família Malvaceae (SOBRAL et al, 2006), *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., popularmente conhecida como açoita-cavalo, é uma árvore que pode atingir 20 a 25 m de altura e um diâmetro de 50 a 80 cm à altura do peito, com tronco geralmente tortuoso e nodoso de base alargada; fuste comumente curto, de 4 a 6 m de comprimento. No interior da floresta densa, porém, desenvolve troncos quase retos e bastante altos. Apresenta madeira moderadamente pesada, de cor clara, de boa trabalhabilidade e de acabamento delicado. A madeira é indicada para a confecção de estruturas de móveis, principalmente em peças torneadas, por ser de baixa durabilidade natural e de boa permeabilidade ao tratamento preservativo (REITZ et al., 1988).

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 variabilidade 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).

As folhas de açoita-cavalo são utilizadas como fitoterápico, no combate à disenteria, leucorréia, reumatismo, blenorragia e tumores, a infusão das flores é empregada contra bronquite; já a raiz, é depurativa (TANAKA et al., 2005).

Açoita-cavalo é uma espécie heliófita, que se encontra nas matas latifoliadas não demasiadamente fechadas, nas matas de pinheirais, em matas de galeria e nas matas das depressões úmidas da Serra do Sudeste. É vista em locais com solos profundos e, também, em solos pedregosos. Desenvolve-se com facilidade nas capoeiras. Distribui-se, especialmente, em regiões de clima temperado (Cfa) (PEDROSO; MATOS, 1987).

Conforme Lorenzi (1992), *L. divaricata* é uma planta pioneira de rápido crescimento que não pode faltar nos reflorestamentos mistos de áreas degradadas de preservação permanente. Reitz *et al.* (1988), atestaram que, considerando seu habitat natural e sua vitalidade como espécie pioneira e heliófita, é possível seu reflorestamento em campo aberto e em populações puras; contudo, é possível que, exposta à luz direta, sua ramificação se verifique de modo muito precoce, não desenvolvendo suficientemente o tronco e o fuste.

A madeira é moderadamente pesada, apresentando peso específico básico de $0,6 - 0,7 \text{ g.cm}^{-3}$, anéis de crescimento bem distintos, cerne de coloração marrom e avermelhado (RICHTER; DALLWITZ, 2009), resistente e extremamente flexível, sendo muito empregada para estruturas de móveis, na confecção de móveis vergados (curvados), peças torneadas, entre outros (LORENZI, 2002).

3.1.1 Aspectos da propagação de açoita-cavalo

A definição de um sistema de produção de mudas de açoita-cavalo é uma necessidade que surge pelo motivo de que essa espécie teve uma presença marcante ao longo da história e do desenvolvimento da indústria madeireira no sul do Brasil. A causa da sua exploração descontrolada e extrativista reduziu-se drasticamente os exemplares com boas características ao uso comercial, levando a procurar sistemas eficientes de produção de mudas (FARIAS, 2006).

Scotti (2009) em estudo da regeneração natural em remanescente de floresta estacional decidual de Santa Maria, RS encontrou que o açoita-cavalo ocorreu de forma irregular nos mecanismos de regeneração natural estudados, também foi representada em baixa densidade na chuva de sementes e banco de sementes do solo, no banco de plântulas e ausente na regeneração natural estabelecida, sendo uma das espécies recomendadas para recuperação de áreas.

Pacheco (2007) testando diâmetros de estacas de açoita-cavalo e concentrações de ácido indol-butírico (AIB), não encontrou influência do fitorregulador na sobrevivência das estacas utilizadas, mas teve influência no enraizamento das estacas, atuando também sobre o diâmetro das mesmas, sendo, quanto maior o diâmetro das estacas melhor o enraizamento.

Farias (2006) após um estudo de produção de mudas de açoita-cavalo em diferentes tamanhos de recipientes e tipos de substratos, recomendou testar alternativas de produção de mudas, podendo ser a partir de estacas ou com a utilização de técnicas de cultura de tecidos.

3.2 Cultura de tecidos e propagação *in vitro*, de espécies lenhosas

Os progressos obtidos nas últimas décadas nas áreas de biologia molecular e genética têm permitido um avanço considerável da biotecnologia, merecendo destaque na área florestal, principalmente aquela relacionada com a propagação *in vitro* e com a engenharia genética (XAVIER, *et al.*, 2009).

A cultura de tecidos consiste no cultivo de órgãos, células ou tecidos vegetais em meio nutritivo apropriado, em condições ambientais assépticas. É uma técnica que oferece excelentes oportunidades para a propagação comercial de plantas, como também pode auxiliar em programas de melhoramento, possibilitando, neste caso, grande economia de tempo. Facilita a obtenção de grande número de plantas, em curto espaço de tempo e em reduzida área de laboratório (PAIVA; GOMES, 1995).

A cultura de tecidos é um processo biotecnológico, através do qual, fragmentos de tecidos vivos, denominados de explantes, são retirados das plantas de interesse e cultivados em um meio nutritivo definido. Os explantes podem ser reduzidos ao tamanho de células individuais, tecidos ou órgãos (SERAFINI *et al.*, 2001).

A técnica de cultura de tecidos baseia-se na teoria da totipotência celular, a qual se caracteriza pela propriedade inerente às células vegetais de manifestar, em momentos diferentes e sob estímulos apropriados, a potencialidade em iniciar um novo indivíduo multicelular (TORRES *et al.*, 2000).

Segundo Xavier *et al.* (2009), a cultura de tecidos compreende muitas técnicas usadas em cultivo *in vitro*, de células, tecidos ou órgãos, às quais têm em comum o uso de meio nutritivo e o fato de serem conduzidas sob condições assépticas. Entre as várias técnicas de cultura de tecidos de relevada importância,

na área florestal, destaca-se a micropropagação como a mais difundida e com aplicações práticas comprovadas.

A propagação vegetativa, processo subjacente à formação de clones, é um método vantajoso quando comparado à reprodução sexuada, uma vez que, se captura o componente genético total, obtendo-se, conseqüentemente, maiores ganhos dentro de uma mesma geração. Ao contrário, na reprodução sexuada, consegue-se fixar apenas o componente genético aditivo de superioridade. (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

Nesse sentido, a cultura de tecidos destaca-se entre os métodos clássicos de propagação vegetativa, por necessitar de menor espaço físico e pelo fato de poder ser desenvolvida em qualquer época do ano. Na área florestal, em particular, pode ser empregada na conservação de germoplasma *in vitro*, na aceleração dos programas de melhoramento, pela multiplicação de clones superiores, visando à produção de mudas, rejuvenescimento de clones selecionados na fase adulta; além de apresentar potencialidade na obtenção de sementes sintéticas, dentre outros. Em função disso, inúmeros trabalhos com espécies florestais vêm sendo desenvolvidos, com o intuito de tornar essa tecnologia acessível e economicamente viável (XAVIER *et al.*, 2009).

Por fim, há que se mencionar, além das vantagens acima mencionadas, que a cultura de tecidos é um processo indispensável na transformação genética de plantas, em especial nas espécies florestais, nas quais a transferência de genes vem sendo utilizada, principalmente, para induzir características como: modificação da composição e teor de lignina, resistência a pragas, tolerância a herbicidas, aumento da produção de biomassa, esterilidade, controle do escape gênico, biorremediação, entre outros (STUDART-GUIMARÃES *et al.*, 2003).

3.2.1 Micropropagação, fitorreguladores e calogênese *in vitro*

A propagação vegetativa *in vitro* ou micropropagação, assim denominada, devido ao tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática dentre as técnicas de cultura de tecidos e a de maior impacto. A atividade comercial de micropropagação é uma realidade e concentra-se, principalmente, na limpeza clonal

e na multiplicação de espécies ornamentais, herbáceas, arbustivas e lenhosas, em especial de árvores elite (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para Xavier *et al.* (2009), a micropropagação pode ser enquadrada como uma técnica de propagação vegetativa *in vitro*; comparada a outras técnicas, têm sido considerada aquela que mais se difundiu nos últimos anos, com aplicações comprovadas em diversas espécies de plantas. Contudo, a micropropagação oferece a possibilidade de propagação de árvores selecionadas em todas as idades, constituindo-se em uma alternativa, em relação aos métodos clássicos de propagação vegetativa.

A experiência, a estrutura disponível, entre outros fatores, é determinante na definição da estratégia mais adequada para se alcançar o sucesso desejado na micropropagação. Podendo, assim, ter necessidade de aplicação de alguns tratamentos destinados à planta matriz, para o fornecimento de explantes mais adequados e responsivos ao cultivo *in vitro* (XAVIER *et al.*, 2007).

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Baseiam-se nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas nas condições de cultivo *in vitro* (TORRES *et al.*, 2001; CALDAS *et al.*, 1998).

As células cultivadas tornam-se responsivas ou receptivas à atividade fitohormonal, pela presença de proteínas específicas, capazes de se ligarem aos fitorreguladores no momento em que existir a demanda fisiológica criada pela planta, em função dos estímulos pelo processo denominado sensibilidade diferencial (TERMIGNONI, 2005).

Os resultados também estão ligados à competência e à determinação celular do conjunto de células do explante. Determinação é a terminologia que tem sido usada para designar a canalização progressiva que é observada durante a ontogênese das células em direção às vias particulares de desenvolvimento (KERBAUY, 1998).

O termo 'competência' indica o potencial de uma determinada célula ou tecido, em se desenvolver em uma forma particular. Para um tecido desenvolver a competência, requer certa quantidade de tempo e/ou exposição a um sinal endógeno ou exógeno (XAVIER *et al.*, 2009).

A formação de órgãos *in vitro* é denominada organogênese e caracteriza-se pela obtenção de eixos caulinares monopolares, originados de gemas pré-existentes ou neoformadas (XAVIER *et al.*, 2007), às quais são induzidas ao enraizamento, resultando em plantas completas passíveis de serem aclimatizadas. A organogênese direta ocorre quando, a partir do explante, tem-se a formação de um órgão ou meristema, diretamente. Em contrapartida, quando a formação de órgãos passa pelo estágio intermediário de calo, o processo recebe o nome de organogênese indireta (THORPE *et al.*, 1991).

A micropropagação pode ocorrer por ambas as rotas, anteriormente citadas, entre outras. Este sistema de produção vegetal está dividido em fases, sendo estas: I- seleção de explantes, desinfestação e estabelecimento da cultura nas condições *in vitro*; II- multiplicação dos propágulos, mediante sucessivas subculturas em meio de cultura adequado à propagação; III- enraizamento dos propágulos vegetativos, obtidos no estágio anterior; e IV- aclimatização das plantas obtidas *in vitro*, na condição *ex vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; XAVIER *et al.*, 2009).

Em função da espécie e dos objetivos a serem alcançados, algumas dessas fases podem ser mais prolongadas e/ou uma fase pode ser adicionada, bem como outras não serem necessárias (XAVIER *et al.*, 2009).

Muitos trabalhos, visando à micropropagação de espécies lenhosas, têm sido realizados, como com *Eucalyptus grandis* (SITA, 1986); *Pinus patula* (McKELLAR *et al.*, 1994); *Swietenia macrophylla* (ROCHA; QUOIRIN, 2004), entre vários outros.

Adicionalmente ao meio de cultura, têm sido acrescentados reguladores de crescimento, a fim de suportar um balanço hormonal que proporcione reatividade dos explantes. Entre os reguladores de crescimento mais utilizados, a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e as auxinas ácido indolacético (AIA) e ácido naftalenoacético (ANA) têm sido aquelas com melhores resultados em proporcionar um balanço hormonal, com respostas satisfatórias em espécies florestais (XAVIER *et al.*, 2009).

O termo 'auxinas' é usado para descrever substâncias naturais e sintéticas que se caracterizam, essencialmente, por favorecer o alongamento celular. Também são definidas como substâncias que produzem modificações na plasticidade das paredes celulares, permitindo o alongamento celular (HINOJOSA, 2000).

Auxinas são compostos com capacidade de promover o alongamento celular em coleótilos e segmentos de caules, divisão celular em culturas de calos em

presença de citocininas, formação de raízes adventícias em folhas ou caules destacados e outros fenômenos do desenvolvimento relacionados com a ação do AIA (TAIZ; ZEIGER, 2009).

As citocininas foram descobertas, durante pesquisas dos fatores que estimulam as células vegetais a se dividirem, desde então, as citocininas têm apresentado muitos outros efeitos nos processos fisiológicos de desenvolvimento. Embora as citocininas regulem muitos processos celulares, o controle da divisão celular é o processo central no crescimento e no desenvolvimento vegetal, sendo considerado indicador para essa classe de reguladores de crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Ao longo do tempo até a atualidade, os estudos de cultura de tecidos têm proporcionado a regeneração de plantas para todos os sistemas de cultura *in vitro*, entre eles encontra-se a cultura de calos (CAMARGO *et al.* 1999; CABONI, *et al.*, 2000; MARTINS *et al.* 2001; ROCHA; QUOIRIN, 2004).

Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a calogênese pode ser utilizada para a regeneração de plantas genotipicamente diferentes das plantas doadoras dos explantes, que apresentem características mais adequadas aos interesses de produção (BEVILACQUA, 2009).

Uma das respostas mais comuns de tecido cultivado *in vitro* é a formação de calo, que depende dos seguintes estádios: desdiferenciação, competência, indução, determinação e diferenciação em um órgão (KERBAUY, 1998). Entretanto, em certos casos, a cultura *in vitro* não promove a formação de calos, mas apenas uma proliferação celular restrita às regiões seccionadas, epidérmicas e subepidérmicas dos explantes, com formação de tecido de cicatrização e zonas de intensa atividade meristemática (FLOH; HANDRO, 1985).

A partir da zona meristemática ou do calo, o padrão de diferenciação pode conduzir a um grau de organização morfo-anatômico peculiar, refletindo na formação de um órgão, constituindo-se no processo denominado organogênese. Quando a formação do órgão é decorrente de tecido do explante, ou de proliferação do mesmo, denomina-se organogênese direta. Quando ocorre a partir de células do calo, denomina-se organogênese indireta (KUNEIDA; KERBAUY, 1986).

3.2.2 Explantes e desinfestação superficial na cultura de tecidos

A desinfestação é uma etapa problemática, pois o desinfestante deve eliminar os microrganismos do tecido vegetal, sem danificar o mesmo. Alguns microrganismos podem ser endógenos ou estarem latentes, tanto em sementes como em brotos. Por essa razão, muitas vezes, a obtenção de tecidos vegetais livres de microrganismos é difícil. Porém, se apenas os meristemas forem retirados, esses, geralmente estão livres de microrganismos (BONGA; DURZAN, 1985).

A desinfestação do material juvenil geralmente não é difícil; entretanto, também são utilizados explantes de material adulto ou de plantas crescidas em condições de campo. A desinfestação de explantes coletados no campo é mais complicada, pois as percentagens de contaminação são freqüentemente altas, quando comparadas aquelas de explantes juvenis ou retirados de mudas mantidas em casa-de-vegetação. A contaminação pode ser reduzida por pulverizações com inseticidas e fungicidas (BONGA; ADERKAS, 1992).

Após definida a fonte de explante mais adequado aos objetivos a serem alcançados com a micropropagação e que apresente potencial de resposta à propagação *in vitro*, ainda há a necessidade de desinfestações que garantam a assepsia dos propágulos vegetativos a serem introduzidos *in vitro* (XAVIER *et al.*, 2009).

Na introdução de explantes em condições *in vitro*, a contaminação é bastante freqüente, por eles estarem expostos às condições naturais, que são fontes de microrganismos. Apesar de a maioria desses microrganismos não ser patogênica, o seu crescimento é acelerado no meio de cultura, a ponto de competirem por nutrientes com os explantes, prejudicando o desenvolvimento destes (YAMAZAKI, 1995; *apud* XAVIER *et al.*, 2009).

Em espécies lenhosas, frequentemente, são encontradas dificuldades como oxidação fenólica, excesso de contaminação por microrganismos, entre outras. Estas variáveis podem sofrer alterações, conforme a intensidade luminosa, tipos de explantes e genótipos utilizados. Para contornar estes eventos, adequações ao meio de cultivo, como composição de nutrientes ou utilização de compostos antioxidantes podem ser utilizados (TEIXEIRA, 2008).

Dentre os agentes usados para a desinfestação dos explantes, inclui-se o cloreto de mercúrio, o ácido clorídrico, o cloreto de benzalcônico, o peróxido de hidrogênio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Outras substâncias com ação germicida, também, são utilizadas na desinfestação dos explantes, sendo comum o etanol e os compostos à base de cloro, como hipoclorito de sódio e de cálcio. As concentrações das soluções desinfestantes, assim como as combinações dos seus princípios ativos e os tempos de exposição, podem variar bastante (XAVIER *et al.*, 2009).

Em alguns casos, são utilizadas algumas gotas de detergente, adicionadas às soluções à base de cloro para melhorar o contato destas com os tecidos, bem como para diminuir a oxidação destes. Normalmente, em espécies florestais tem sido adotada uma incubação inicial no escuro, visando contornar os efeitos negativos provocados pela oxidação de compostos fenólicos que são liberados pelas células danificadas pelo corte na preparação do explante, problemas que podem surgir em razão da espécie e do tipo de explante usado (XAVIER *et al.*, 2009).

Uma vez obtidas as condições desejadas na etapa de estabelecimento da cultura *in vitro*, a etapa seguinte refere-se à multiplicação da cultura para a obtenção da quantidade de mudas micropropagadas desejadas, quando se visa atingir alta taxa de multiplicação, com o mínimo de variação de explante para explante, livres de contaminantes que prejudiquem a micropropagação, gemas reativas e que produzam partes aéreas com qualidade suficiente para a fase seguinte (XAVIER *et al.*, 2009).

4 CAPÍTULO I

GERMINAÇÃO ASSÉPTICA DE SEMENTES E ESTABELECIMENTO IN VITRO DE EXPLANTES DE AÇOITA-CAVALO

4.1 Material e métodos

Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS.

As sementes de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., foram coletadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro, unidade Florestas, no ano de 2008. Após a coleta, as sementes foram armazenadas por um período de três meses, em câmara fria a temperatura de 10-12 °C e umidade relativa de 35-40%, sendo, a seguir, conservadas em geladeira (a 8 - 10° C) até serem utilizadas nos trabalhos de cultura de tecidos, efetuados ao longo de 2008 e 2009, descritos no presente capítulo.

Com a finalidade de caracterização do lote, foram realizados testes de germinação e sanidade com as sementes, imediatamente após seu beneficiamento e antes do armazenamento. Para determinar a germinação, as sementes foram dispostas em caixas plásticas tipo “gerbox”, contendo duas folhas de papel filtro umedecidas, até atingirem três vezes a massa seca do papel. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com oito repetições, cada uma composta por 25 sementes, representando uma unidade experimental (UE), sendo avaliadas sementes germinadas, duras e mortas. As UE permaneceram durante 28 dias em câmara de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Para a realização do teste de sanidade, as sementes foram dispostas em caixas plásticas tipo “gerbox”, contendo duas folhas de papel filtro umedecidas, até atingirem três vezes a massa seca do papel. Utilizou-se o delineamento

experimental inteiramente casualizado, com oito repetições, cada uma composta por 25 sementes. As UE permaneceram, durante sete dias, em câmara de crescimento, com temperatura controlada de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

I – Germinação asséptica de sementes de açaíta-cavalo, empregando-se desinfestação superficial com bicloreto de mercúrio (HgCl_2)

Para a germinação asséptica de açaíta-cavalo, foram utilizados tratamentos de desinfestação superficial, submetendo-se as sementes à imersão em água quente, a temperatura de 60 ± 5 °C, por 10 minutos, seguida por imersão em etanol a 70% (v/v), por 30 segundos, imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% (v/v), por 10 minutos, e, por último, imersão em bicloreto de mercúrio nas concentrações de 0,05% e 0,1%, ambas por 15 minutos; 0,2%, 0,3%, 0,4% e 0,6%, por 10 minutos; e 0,5% (p/v), por 15 minutos, totalizando sete tratamentos.

Em todos os tratamentos, após o procedimento de desinfestação, as sementes foram submetidas a um triplo enxágüe com água estéril, antes da sua inoculação no meio de cultivo, para a remoção de resíduos das soluções desinfestantes.

O meio de cultivo utilizado para a germinação foi o meio base *Woody Plant Medium* (WPM) (LLOYD; McCOWN, 1981), acrescido de 3% (p/v) de sacarose, 0,7% (p/v) de ágar e 0,01% (p/v) de mio-inositol, sendo o pH ajustado para 5,8. Posteriormente, os frascos foram vedados com papel alumínio e autoclavados à temperatura de 121 °C e 1 atm, por 15 minutos.

As sementes, utilizadas como explantes foram inoculadas sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar com o auxílio de pinças previamente esterilizadas em autoclave, à temperatura de 121 °C e 1 atm, durante 40 minutos.

A unidade experimental (UE) foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 ml, contendo 30 ml de meio de cultivo e quatro sementes cada. Após a inoculação das sementes, os frascos vedados com papel alumínio foram dispostos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia e

temperatura de 25 ± 3 °C, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

Aos 60 dias de cultivo, foram realizadas avaliações das variáveis: germinação *in vitro* (%), contaminação fúngica (%) e bacteriana (%), comprimento da parte aérea (mm), comprimento da raiz principal (mm), formação de raiz primária (%) e de raiz secundária (%). Igualmente, foi registrada a porcentagem de plantas normais e plantas anormais.

Foi verificada a ocorrência de distribuição normal dos dados e as variáveis, no caso de significância, foram transformadas para $\sqrt{x/100 + 0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, no caso de significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000).

II – Germinação asséptica de sementes de açoita-cavalo, empregando-se desinfestação superficial com fungicidas

As sementes foram submetidas à imersão em água quente a temperatura de 60 ± 5 °C, por 10 minutos, seguida por imersão em etanol a 70% (v/v), por 30 segundos, imersão em hipoclorito de sódio a 3% (v/v), por 10 minutos, e, finalmente, imersão em bicloreto de mercúrio, a 0,3% (p/v), por 10 minutos. Posteriormente, as sementes foram submetidas a um triplo enxágüe com água estéril. Após este procedimento inicial de desinfestação, foram utilizados fungicidas dos grupos químicos Dicarboximida (Captan®) e Benzimidazol (Cercobin®) com a finalidade de promover o controle da contaminação fúngica na germinação *in vitro* das sementes.

Em ambos os casos, as sementes foram submetidas à imersão por 10 minutos, em soluções contendo concentrações de 0; 1,5; 3,0; 4,5 e 6,00 g L⁻¹ de Dicarboximida e 0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g L⁻¹ de Benzimidazol; sendo que, com este, também foi testado o seu efeito quando adicionado ao meio de cultivo, utilizando-se as mesmas concentrações empregadas no tratamento de imersão de sementes.

Após os tratamentos de imersão das sementes nas soluções contendo fungicidas, estas foram submetidas, novamente, a um triplo enxágue com água estéril.

O meio de cultivo utilizado para a germinação foi o meio base *Woody Plant Medium* (WPM) (LLOYD; McCOWN, 1981), acrescido de 3% (p/v) de sacarose, 0,7% (p/v) de ágar e 0,01% (p/v) de mio-inositol, sendo o pH ajustado para 5,8. Posteriormente, os frascos foram vedados com papel alumínio e autoclavados à temperatura de 121 °C e 1 atm, por 15 minutos. No meio de cultivo contendo o fungicida (Cercobin®), sua adição foi efetuada antes do ajuste do pH, sendo, após, realizada a autoclavagem.

As sementes utilizadas como explantes, foram inoculadas sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar com o auxílio de pinças previamente esterilizadas em autoclave, à temperatura de 121 °C e 1 atm, durante 40 minutos.

A unidade experimental (UE) foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 ml, contendo 30 ml de meio de cultivo e quatro sementes cada. Após a inoculação das sementes, os frascos vedados com papel alumínio, foram dispostos em sala de cultivo, sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia e temperatura de 25 ± 3 °C, em delineamento inteiramente casualizado, com 15 tratamentos e seis repetições.

Aos sete e aos 45 dias de cultivo, foram avaliadas a contaminação fúngica e bacteriana, e a germinação *in vitro*, todas expressas em porcentagem. Aos 45 dias foram avaliadas, adicionalmente, a porcentagem de plantas normais e plantas anormais.

Foi verificada a ocorrência de distribuição normal dos dados e as variáveis, no caso de significância, foram transformadas para $\sqrt{x/100 + 0,5}$, sendo x o valor observado. As variáveis foram submetidas à análise de variância e, no caso de significância, à análise de regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® versão 4.0 (FERREIRA, 2000).

III – Sobrevivência e estabelecimento *in vitro* de explantes de açoita-cavalo

Foram utilizados como explantes, segmentos nodais e segmentos apicais caulinares, com aproximadamente 1 cm de comprimento, oriundos de plantas germinadas *in vitro*, com cerca de 60 dias de idade.

O meio de cultivo utilizado foi o meio base *Woody Plant Medium* (WPM) (LLOYD; McCOWN, 1981), acrescido de 3% (p/v) de sacarose, 0,7% (p/v) de ágar e 0,01% (p/v) de mio-inositol, sendo o pH ajustado para 5,8. Posteriormente, os frascos foram vedados com papel alumínio e autoclavados à temperatura de 121 °C e 1 atm, por 15 minutos. Os explantes foram inoculados sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar com o auxílio de pinças previamente esterilizadas em autoclave, a 121° C e 1 atm, durante 40 minutos.

A unidade experimental (UE) foi composta por quatro frascos de vidro com capacidade para 150 ml, contendo 30 ml de meio de cultivo e dois explantes cada. Após a inoculação dos explantes, os frascos vedados com papel alumínio, foram dispostos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia e temperatura de 25 ± 3 °C, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

Aos 60 dias de cultivo, foram realizadas avaliações das variáveis: sobrevivência (%) e estabelecimento *in vitro* (%), número de nós, número de folhas e formação de raiz (%). A sobrevivência foi indicada pela coloração verde do explante e o estabelecimento, pela formação de novas gemas ou folhas.

Foi verificada a ocorrência de distribuição normal dos dados e as variáveis, no caso de significância, foram transformadas para $\sqrt{x/100 + 0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, no caso de significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000).

4.2 Resultados e discussão

Caracterização da qualidade fisiológica e sanitária do lote de sementes

As análises de qualidade fisiológica realizadas com as sementes do lote empregado, com a finalidade de caracterização, resultaram em uma germinação de 45%, não sendo verificadas sementes mortas e havendo 55% de sementes duras.

Após a realização do teste de sanidade, verificou-se a presença de microrganismos no lote de sementes utilizado, destacando-se, entre as principais ocorrências, fungos dos gêneros *Alternaria sp*, *Phoma sp* e *Cladosporium sp*, com 72%; 38% e 34%, respectivamente. Em adição a estes, foi observada a presença dos gêneros *Epicoccum sp* (22%), *Penicillium sp* (20%), *Aspergillus sp* (5%), *Botrytis sp* (5%) e *Curvularia sp* (3%). Não foram identificadas bactérias no lote analisado.

I – Germinação asséptica de sementes de açoita-cavalo, empregando-se desinfestação superficial com bicloreto de mercúrio (HgCl_2)

Sete dias após a inoculação das sementes no meio de cultivo, apareceram os primeiros indícios de contaminação causada por fungos, não sendo verificada, ainda, nessa data de avaliação, a presença de bactérias.

Após 60 dias de cultivo *in vitro*, para as variáveis contaminação fúngica e bacteriana (Figura 1), não houve diferenças significativas entre os tratamentos, observando-se reduzidas médias gerais (15% e 2,86% respectivamente). Pode-se inferir, portanto, que o bicloreto de mercúrio, tal vez foi eficiente em controlar estes microrganismos associados às sementes, empregadas como explantes, neste trabalho. Entretanto, a presença destes agentes contaminantes, ainda que em baixos níveis, é indesejável na cultura de tecidos, pela competição que exercem com os cultivos e pela possibilidade de contaminar outras culturas em desenvolvimento no mesmo ambiente, motivando desenvolver metodologias mais eficientes de desinfestação superficial.

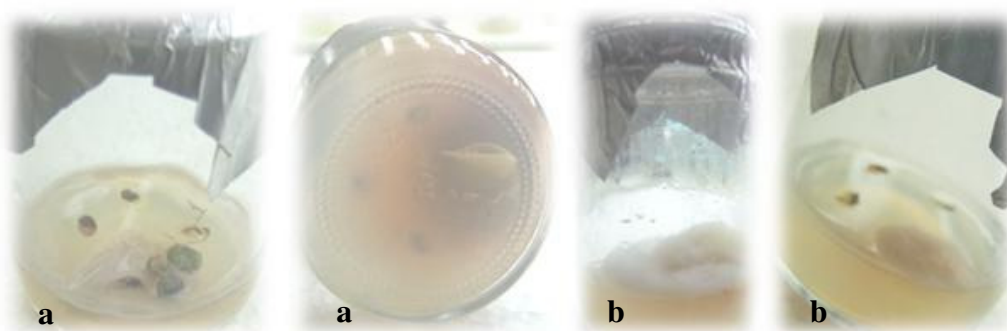


Figura 1 — Sementes de *Luehea divaricata* (Mart. & Zucc.) aos 60 dias de cultivo *in vitro*, após serem submetidas à imersão em bicloreto de mercúrio (HgCl_2), a diferentes concentrações, apresentando contaminação bacteriana (a) e contaminação fúngica (b). UFSM, Santa Maria, RS, 2010.

Flôres (2007) observou médias de contaminação fúngica, em torno de 30%, em sementes de açoita-cavalo, após efetuar a desinfestação por imersão em solução de bicloreto de mercúrio em concentrações de 0,05% e 0,1%, durante 10 minutos. Provavelmente, o melhor controle destes microrganismos, registrado no presente trabalho, deva-se aos comparativamente maiores tempos de contato do bicloreto de mercúrio com as sementes, já que as concentrações empregadas foram idênticas.

Outro fator que deve ser considerado é a qualidade sanitária inicial dos lotes empregados. Flôres (2007) utilizou sementes de açoita-cavalo, de dois lotes diferentes, colhidos em 2004 e em 2005, e identificou gêneros fúngicos semelhantes aos identificados no lote utilizado no presente experimento, porém, em porcentagens maiores, em alguns casos, em relação àquelas registradas neste lote de 2008.

Contrariamente, no que diz respeito à contaminação bacteriana, Flôres (2007), observou 25% e 7,5% de bactérias presentes nos lotes de açoita-cavalo de 2004 e de 2005, respectivamente, na caracterização inicial. Já, no cultivo *in vitro*, este autor verificou 2,5% no lote de 2004 e ausência de bactérias, em 2005, após tratar as sementes com 0,05% e 1% de bicloreto de mercúrio, durante 10 minutos.

Utilizando-se estas mesmas concentrações de bicloreto de mercúrio, porém por imersão, durante 15 minutos, não foram registradas bactérias no presente experimento, ratificando a provável eficiência do bicloreto de mercúrio no controle destes agentes na germinação *in vitro* de sementes de açoita-cavalo.

Igualmente, uma concentração de 0,05% de cloreto de mercúrio, na imersão por 10 minutos, revelou-se eficiente na desinfestação de explantes de *Aspidosperma polyneuron* (RIBAS *et. al.*, 2005).

No que diz respeito à germinação, não foi verificada diferença significativa entre as concentrações de bicloreto de mercúrio e tempos de imersão testados, obtendo-se uma média geral de 58,57%, superior à observada (45%), cerca de 120 dias antes, quando da caracterização inicial do lote. Essa diferença pode ser decorrente da superação de dormência e/ou do controle da contaminação por microrganismos promovidos pela desinfestação superficial, que incluiu, além do bicloreto de mercúrio, a imersão de sementes em água quente em todos os tratamentos.

A água quente auxilia no controle de microrganismos associados às sementes, os quais competem com o vegetal, principalmente na etapa inicial do cultivo, e pode ter contribuído para a superação da dormência em sementes de açoita-cavalo, a exemplo do que ocorre em várias outras espécies.

Em experimentos de quebra de dormência e desinfestação de sementes de *Peltophorum dubium*, Oliveira *et al.* (2003), verificaram que a utilização de tratamento de imersão das sementes em água quente a 95 °C, deixadas fora de aquecimento por 24 horas, resultou eficiente na promoção da germinação, sendo prático e dispensando o uso de tratamentos de desinfestação com produtos químicos, testados também no mesmo experimento.

Da mesma maneira, Flôres (2007) afirmou que o emprego da água quente aumentou a germinação das sementes de açoita-cavalo, considerando que o lote de sementes, com germinação média inicial de 26,50%, depois de realizados os tratamentos de assepsia, incluindo o tratamento com água quente, teve aumentada para 38% a média de germinação no cultivo *in vitro*.

As sementes iniciaram a germinação sete dias após a inoculação, observando-se a emissão da radícula, e o posterior desenvolvimento de raízes primárias e secundárias, em alguns tratamentos. A partir da terceira semana, ocorreu a emergência do epicótilo e, na sequência dos nós cotiledonares e do primeiro par de folhas, na maioria dos tratamentos, até observar-se a formação de plantas inteiras em, aproximadamente, 40 dias, conforme pode ser visualizado na Figura 2.



Figura 2 – Plantas de *Luehea divaricata* (Mart. & Zucc.) germinadas *in vitro* com 40 dias de idade, após tratamentos de desinfestação com diferentes concentrações de bicloreto de mercúrio (HgCl₂). UFSM, Santa Maria, RS, 2010.

A elongação do epicótilo e a expansão do limbo foliar do primeiro par de folhas foram verificadas, entre a terceira e a quinta semana, após a inoculação das sementes no meio nutritivo.

A presença de microrganismos contaminantes, tal vez, não comprometeu, portanto, a germinação *in vitro* das sementes. Flôres (2007) obteve germinação de 21,2 a 52,5%, aos 60 dias após a inoculação de sementes de açaíta-cavalo, desinfestadas mediante a imersão em solução de bicloreto de mercúrio a 0,05% e a 0,6%, resultado semelhante ao obtido neste trabalho. No entanto, este autor observou a ocorrência de clorose nas folhas formadas *in vitro*, o que também aconteceu no presente trabalho, mas em um nível muito reduzido e somente na etapa final do período de cultivo.

Considerando-se o exposto, não se pode associar, exclusivamente, à presença do bicloreto de mercúrio, a clorose foliar, já que o cultivo, sem transferências para meios de cultivos frescos, estendeu-se além do período usual para açaíta-cavalo que é de cerca de 30 dias. Provavelmente, a depleção de nutrientes no meio de cultivo tenha contribuído para o aparecimento de folhas cloróticas.

Em relação ao comprimento da parte aérea e do sistema radicular (Figura 3), da formação de raiz primária e de secundárias (Figura 4), aos 60 dias, não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos aplicados.

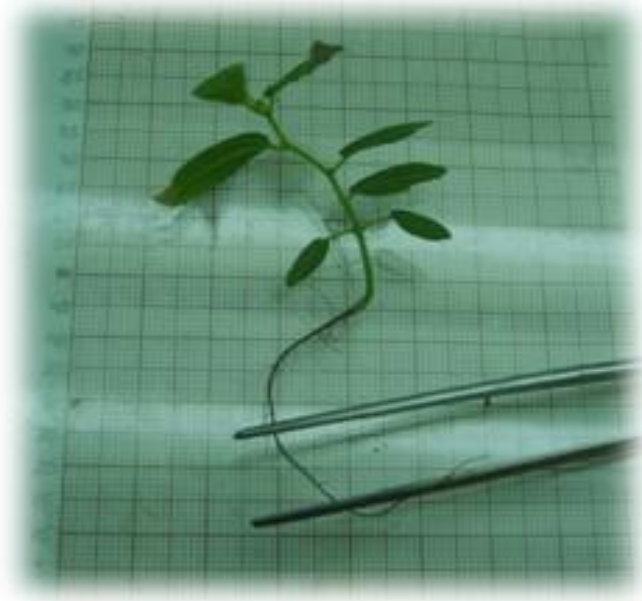


Figura 3 – Parte aérea e sistema radicular de plantas de *Luehea divaricata* (Mart. & Zucc.) obtidas a partir de explantes de origem seminal, com 60 dias de idade, após tratamento de desinfestação com diferentes concentrações de bicloreto de mercúrio (HgCl_2). UFSM, Santa Maria, RS, 2010.

O desenvolvimento da parte aérea registrou média geral de 18,27 mm, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, enquanto, o sistema radicular cresceu, no mesmo período, em média, 23,58 mm. A porcentagem média de formação de raiz primária foi de 54,43%, sendo a média, de formação de raízes secundárias, de 42,86%. Igualmente, assim como foi observado em relação à germinação *in vitro*, pode-se inferir que o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular não foi comprometido pela presença de microrganismos contaminantes no meio de cultivo, tampouco o bicloreto de mercúrio apresentou toxicidade às plantas germinadas *in vitro*. Contribuindo para ratificar essa constatação, não foi observada a formação de plantas anormais de açoita-cavalo.

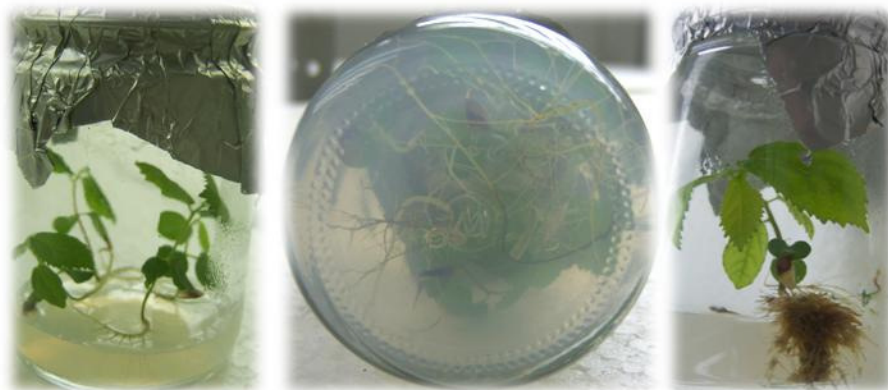


Figura 4 – Aspecto geral do sistema radicular de plantas de *Luehea divaricata* (Mart. & Zucc) obtidas a partir de explantes de origem seminal, com 60 dias de idade, após o tratamento de desinfestação com diferentes concentrações de bicloreto de mercúrio (HgCl_2). UFSM, Santa Maria, RS, 2010.

Entretanto, trabalhos realizados com outras espécies vegetais, como *Galinsoga parviflora* e *Bidens pilosa*, testando o bicloreto de mercúrio, em concentrações entre 0,05 e 1,0 mM, demonstraram sua influência na germinação de ambas as espécies, afetando, negativamente, a taxa de germinação. Da mesma maneira, este agente desinfestante reduziu a área foliar, o comprimento do caule, da raiz e a produção de matéria seca (TOZZI *et al.*, 2007).

Na otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa*, utilizando tratamentos de desinfestação que incluíam imersão no fungicida Benomyl, em etanol a 70%, em hipoclorito de sódio a 1% e, por fim, em bicloreto de mercúrio 0,1%, por 5 minutos: 65% das plantas desenvolveram brotos normalmente, 23,1% mostraram sintomas de toxidez na parte basal, com aparecimento de necrose, engrossamento e curvatura, ao passo que 15,4% dos explantes apresentaram folhas mal formadas, com pouco desenvolvimento ou curvatura anormal (FLORES *et al.*, 2006). Os autores concluíram que os tratamentos aplicados foram eficientes no controle das contaminações fúngica e bacteriana.

Esses resultados demonstram a presença de variação no efeito tóxico do bicloreto de mercúrio, empregado como desinfestante de explantes na cultura *in vitro*, comportamento que pode ser atribuído a fatores como o estado sanitário e fisiológico na origem dos explantes, à manipulação efetuada durante o isolamento dos explantes e na aplicação dos tratamentos. Além disso, há que se levar em

consideração características intrínsecas às espécies, como o nível de tolerância a compostos à base de cloro e de mercúrio.

II – Germinação asséptica de sementes de açoita-cavalo, empregando-se desinfestação superficial com fungicidas

Aos sete dias após inoculação das sementes no meio de cultivo, foram verificadas diferenças significativas para a contaminação fúngica e bacteriana, não ocorrendo, no entanto, ajuste significativo a nenhuma equação.

Foram registradas médias de 8,33% de contaminação por fungos nas culturas quando as sementes foram imersas nos fungicidas do grupo Dicarboximida (Captan®); de 11,67 %, quando o fungicida do grupo Benzimidazol (Cercobin®) foi adicionado ao meio WPM; e, a máxima, de 12,5%, após o contato das sementes, antes da inoculação no meio de cultivo, com o fungicida do grupo Benzimidazol. A presença de fungos, uma semana após o início do cultivo *in vitro*, pode ser considerada elevada, considerando-se que, no experimento anterior, após a desinfestação, utilizando-se apenas bicloreto de mercúrio, houve, após 60 dias, 15% de contaminação fúngica, revelando que o uso combinado deste agente desinfestante e fungicidas, não foi eficiente.

Em relação às bactérias, neste mesmo período, foram obtidas médias de 10%, após a imersão em Captan®, de 18,33% quando Cercobin® foi aplicado no meio WPM e de 20%, após o contato das sementes com Cercobin®. Igualmente ao que foi observado em relação aos fungos, a associação de bicloreto de mercúrio aos fungicidas não promoveu um controle mais eficiente das bactérias, verificando-se uma maior frequência destes microrganismos relativamente àquela registrada, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, após a desinfestação ter sido efetuada pelo emprego isolado de bicloreto de mercúrio (2,86%).

Após 45 dias de cultivo *in vitro*, igualmente, houve diferenças significativas entre os tratamentos de desinfestação superficial para as variáveis respostas avaliadas, contudo não foi possível o ajuste das médias a nenhuma equação de regressão.

A contaminação por fungos, nesse período, apresentou médias de 26,67%, de 55% e de 63,33%, respectivamente, quando Cercobin® foi incluído no meio WPM, após os explantes terem sido desinfestados por contato com os fungicidas Captan®, e quando Cercobin® foi usado na solução de imersão. Decorridos 45 dias de cultivo, a contaminação fúngica foi muito elevada, confirmando as expectativas desenvolvidas, após a avaliação inicial e ratificando a ineficiência do procedimento de desinfestação superficial.

Em outro trabalho relacionado à germinação *in vitro* de sementes de açaí-cavalo, (FLÔRES, 2007), avaliou os fungicidas Thiabendazole® e Captan®, nas concentrações de 8 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹, respectivamente, isolados ou associados, não obtendo diferenças significativas entre os tratamentos, e observando médias de contaminação fúngica de 35% a 62%.

A presença de bactérias, aos 45 dias de cultivo *in vitro* aumentou em relação à primeira avaliação, observando-se médias de 18,33%, no tratamento com Cercobin® no meio de cultivo, de 27,5%, com Captan®, e de 50,83%, após imersão em Cercobin®. A partir desses resultados, pode-se depreender que, apesar de não ser mais eficiente que o uso isolado de bicloreto de mercúrio, a inclusão de Cercobin® no meio WPM possibilitou um controle mais prolongado na população bacteriana que já estava presente, após sete dias de cultivo, relativamente àqueles promovidos pelos fungicidas em imersão.

De uma maneira geral, a germinação *in vitro* foi muito baixa, observando-se médias de 23,33%, no tratamento em que o Cercobin® foi acrescentado ao meio de cultivo, de 21,67%, quando as sementes tiveram contato com Captan® e de 18,33%, com Cercobin®. Essa reduzida germinação das sementes deve-se, provavelmente, à associação de uma série de fatores: diminuição na viabilidade das sementes em função do armazenamento, uma vez que este experimento foi realizado cerca de dez meses, após a colheita das sementes; elevada contaminação por microrganismos, depleção de nutrientes no meio de cultivo e, adicionalmente, efeito fitotóxico dos fungicidas. Ratificando esse efeito detrimental dos fungicidas utilizados, foram observadas plantas anormais: 12,5% com Cercobin® no meio de cultivo, 4,17%, quando as sementes foram imersas em Captan® e 2,5% quando imersas em Cercobin®.

A imersão de sementes de *Genipa americana* em fungicida Benzimidazol, em concentrações de 0 a 100 g L⁻¹, durante 10 minutos, ou em Ditiocarbamato, em

concentrações de 0 a 5 g L⁻¹, por 5 minutos, não reduziu a germinação. No entanto, nas maiores concentrações avaliadas, as sementes apresentaram menor velocidade de germinação pelo efeito fitotóxico do produto (VIEIRA; GUSMÃO, 2006).

Na germinação *in vitro* de sementes de erva mate (*Ilex paraguariensis*), Júnior *et al.* (1999), avaliaram os fungicidas Captan®, Thiabendazole® e Thiram®, verificando que somente Thiram® apresentou efeito negativo, não sendo verificada diferença significativa entre os outros fungicidas.

O emprego do Benomyl® (Benzimidazol) em concentrações de 2 a 14 g L⁻¹, em meio MS, para o controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile*, Londe *et al.* (2007), verificaram que a utilização desse fungicida na concentração de 12 g L⁻¹, controla eficazmente fungos do gênero *Aspergillus*, embora a concentração utilizada não impediu a proliferação de outros gêneros fúngicos.

Por sua vez, Sato *et al.* (2001), testaram o efeito de Benlate® em *Celtis sp* sobre as gemas apicais e laterais, tratadas com 200 mg L⁻¹ deste fungicida, verificando que a concentração empregada inibiu o crescimento de fungos sem causar fitotoxidez aos explantes. Da mesma maneira, Flôres (2007), após empregar Captan® e Thiabendazole®, para promover a desinfestação superficial de sementes de açoita-cavalo, não observou diferenças significativas entre os tratamentos, relatando médias de germinação de 23% a 51%, respectivamente.

III – Sobrevivência e estabelecimento *in vitro* de explantes de açoita-cavalo

Não foram verificadas diferenças significativas entre os explantes utilizados (segmentos apicais caulinares e segmentos nodais) para sobrevivência e estabelecimento *in vitro*, número de nós e porcentagem de formação de raiz.

Registraram-se médias gerais elevadas de sobrevivência (83,75%) e de estabelecimento (80%) *in vitro* das culturas, indicando que ambos os explantes avaliados são aptos para uso em cultura de tecidos. Essa redução observada no estabelecimento em relação aos explantes que sobreviveram, está de acordo com o relatado por Erig e Schuch (2003), em *Malus domestica* Borkh. cvs. Galaxy,

Maxygala e Mastergala, considerando-se que a sobrevivência nem sempre indica a retomada do crescimento e do desenvolvimento.

Foi obtida uma média de 12,9 nós e 33,75% das culturas *in vitro*, formaram raízes aos 60 dias de cultivo. O número de nós produzido nessas condições foi satisfatório, sendo possível depreender que a suplementação de reguladores de crescimento permitirá otimizar a taxa de multiplicação em açoita-cavalo.

Flôres (2007), testando explantes de segmentos nodais de açoita-cavalo, em meio WPM, com orientações de 45° e 90°, obteve produção média de apenas 1,43 e 2,20 nós, respectivamente, o que indica a eficiência na produção dessa variável neste experimento. O mesmo autor, em outro experimento, testando meio MS e WPM, observou resposta diferente em explantes de segmentos nodais em relação à produção de nós, verificando uma média de 4,94 para essa variável.

O enraizamento observado foi, igualmente, produzido na ausência de reguladores de crescimento, o que indica a possibilidade de melhorar essa resposta pela adição de auxinas ao meio de cultivo. De maneira semelhante, em brotações de *Ficus carica* L. (BRUM, 2001), não foi necessário utilizar fitorreguladores para promover a formação de raízes. No entanto, para outras espécies, o enraizamento somente é verificado na presença de fitorreguladores, devido a características intrínsecas, o que, provavelmente, deve-se ao balanço hormonal endógeno, presente no tecido vegetal (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Em *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Taudel, foram obtidos 73% de enraizamento pelo cultivo em meio WPM suplementado, com 1,5 mg L⁻¹ de ácido 3-Indolbutírico (AIB) (MANTOVANI *et al.*, 2001).

Flôres (2007), também avaliando esses dois explantes em açoita-cavalo, após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio MS e WPM, igualmente, não observou desempenho diferenciado, para os dois fatores principais, em relação à sobrevivência (95%) e ao estabelecimento (80,45%). Entretanto, verificou melhor resposta, no número de nós (4,94) e no enraizamento (66,8%), quando o cultivo foi realizado no meio de cultura WPM.

Para número de folhas, houve diferença significativa entre os explantes, em que os segmentos nodais (31,6) produziram mais que os segmentos apicais caulinares (19,8). A maior produção de folhas, a partir de segmentos nodais, é decorrente do maior número de gemas com capacidade de emitir novas brotações, presentes nestes explantes em comparação aos segmentos apicais.

Já, Franzin *et al.* (2004), para obtenção de brotações aéreas *in vitro* de *Rollinia salicifolia*, utilizando explantes de segmentos nodais da região basal e apical de ramos jovens inoculados em meio MS a 50% e a 33% da concentração de sais, registraram, aos 45 dias de cultivo, que os segmentos nodais da região basal apresentaram melhor brotação aérea e que o meio MS reduzido à 50% resultou em efeito superior na formação de brotações, em relação ao tamanho e ao número de folhas.

4.3 Conclusões

Não foram observadas diferenças entre as concentrações de bicloreto de mercúrio e tempos de imersão das sementes de açoita-cavalo, podendo ser empregada qualquer um deles.

O uso dos fungicidas Captan® ou Cercobin®, após procedimento de desinfestação que inclui bicloreto de mercúrio, não é eficiente em controlar as contaminações fúngicas e bacterianas, além de apresentar efeito fitotóxico, comprometendo a germinação *in vitro* e ocasionando a formação de plantas anormais em açoita-cavalo.

O estabelecimento *in vitro* de açoita-cavalo é efetuado, com sucesso, a partir do cultivo de segmentos apicais e segmentos nodais, embora os segmentos nodais apresentem um maior número de folhas.

5 CAPITULO II

REGENERAÇÃO E CALOGÊNESE *IN VITRO* EM AÇOITA-CAVALO COM A UTILIZAÇÃO DE FITORREGULADORES

5.1 Material e métodos

Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS.

Foram utilizados como explantes, segmentos nodais e fragmentos foliares de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., isolados de plantas germinadas *in vitro*, com aproximadamente 60 dias de idade, no próprio Laboratório.

I – Regeneração *in vitro* de segmentos nodais com o emprego de diferentes concentrações de fitorreguladores

Segmentos uninodais de, aproximadamente, 1 cm de comprimento foram cultivados em meio *Woody Plant Medium* (WPM) (LLOYD, McCOWN, 1981), suplementado da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0,00; 0,22; 0,44 e 0,88 μM em combinação com a auxina ácido naftaleno acético (ANA) com 0,00 e 0,054 μM de concentração.

Ao meio base WPM, foram adicionados 3% (p/v) de sacarose, 0,7% (p/v) de ágar e 0,01% (p/v) de mio-inositol, sendo o pH ajustado para 5,8. Posteriormente, os frascos foram vedados com papel alumínio e autoclavados à temperatura de 121 °C e 1 atm, por 15 minutos.

Os explantes foram inoculados sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de pinças previamente esterilizadas em autoclave, à temperatura de 121 °C e 1 atm, durante 40 minutos.

A UE foi composta por dois frascos de vidro com capacidade para 150 ml, contendo 30 ml de meio de cultivo e um explante cada. Após a inoculação dos explantes, os frascos vedados com papel alumínio, foram dispostos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia e temperatura de $25 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$, em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x2, com quatro repetições por tratamento.

Aos 45 dias de cultivo, foram realizadas avaliações das variáveis: contaminação fúngica (%) e bacteriana (%), sobrevivência (%) e estabelecimento *in vitro* (%), número de brotos, número de folhas, formação de calo (%) e de raiz (%).

Foi verificada a ocorrência de distribuição normal dos dados e as variáveis, no caso de significância, foram transformadas para $\sqrt{x/100 + 0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, para os tratamentos quantitativos, foi efetuada análise de regressão polinomial, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 4.0 (FERREIRA, 2000).

II – Calogênese, a partir de fragmentos foliares de açoita-cavalo

Foi avaliada a resposta de fragmentos foliares, oriundos de plantas germinadas *in vitro*, com aproximadamente 60 dias de idade, em relação à combinação da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0,00; 22,20; 44,40 e 88,80 μM e da auxina ácido naftaleno acético (ANA) concentrados em 0,00; 1,34; 2,68 e 5,36 μM . Os fragmentos retangulares com, aproximadamente, 25 mm^2 de superfície, foram excisados com o auxílio de bisturi e inoculados com a face abaxial no meio de cultivo.

O meio de cultivo utilizado foi o meio base *Woody Plant Medium* (WPM) (LLOYD, McCOWN, 1981), acrescido de 3% (p/v) de sacarose, 0,7% (p/v) de ágar e 0,01% (p/v) de mio-inositol, sendo o pH ajustado para 5,8. Posteriormente, os frascos foram vedados com papel alumínio e autoclavados à temperatura de $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1 atm, por 15 minutos.

Os explantes foram inoculados sob condições assépticas na câmara de fluxo laminar com o auxílio de pinças previamente esterilizadas em autoclave, à temperatura de $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 1 atm, durante 40 minutos.

A unidade experimental (UE) foi composta por um frasco de vidro com capacidade para 150 ml, contendo 30 ml de meio de cultivo e quatro explantes cada. Após a inoculação dos fragmentos foliares, os frascos vedados com papel alumínio, foram dispostos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia e temperatura de $25 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$, em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 4x4, com diferente número de repetições, 4 a 5 por tratamento, em função da disponibilidade de explantes.

Aos 45 dias de cultivo, foram avaliadas as respostas dos explantes em relação à calogênese, sendo atribuídas notas de zero a quatro, conforme descrito: 0, para explante oxidado e/ou contaminado; 1, explante sem alterações morfológicas; 2, explantes com bordas onduladas; 3, explantes com formação de pequenos calos; e 4, para a presença de calos totalmente formados. Os explantes que receberam notas 3 e 4 foram considerados para determinar a porcentagem de formação de calos. Adicionalmente, foi verificado o número médio de calos por UE.

Foi verificada a ocorrência de distribuição normal dos dados e as variáveis, no caso de significância, foram transformadas para $\sqrt{x/100 + 0,5}$, sendo x o valor observado. As variáveis foram submetidas à análise de variância e à análise de regressão polinomial, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® versão 4.0 (FERREIRA, 2000).

5.2 Resultados e discussão

I – Regeneração *in vitro* de segmentos nodais com o emprego de diferentes concentrações de fitorreguladores

Em relação à sobrevivência *in vitro* dos segmentos nodais, foi verificada diferença significativa entre as concentrações testadas de BAP, obtendo-se 93,75% de sobrevivência na presença de 0,44 μM deste fitorregulador. Na Figura 5, pode-se observar que o aumento da concentração de BAP de 0,22 μM para 0,44 μM

promoveu uma maior sobrevivência dos explantes, no entanto, com o aumento adicional para 0,88 µM, houve uma redução nessa variável. Dessa maneira, o uso de altas concentrações dessa citocinina pode ser prejudicial à sobrevivência de segmentos nodais. Flôres (2007), testando níveis de BAP, dez vezes mais concentrados que àqueles utilizados no presente trabalho, obteve média de 78,75% de sobrevivência de segmentos nodais de açoita-cavalo.

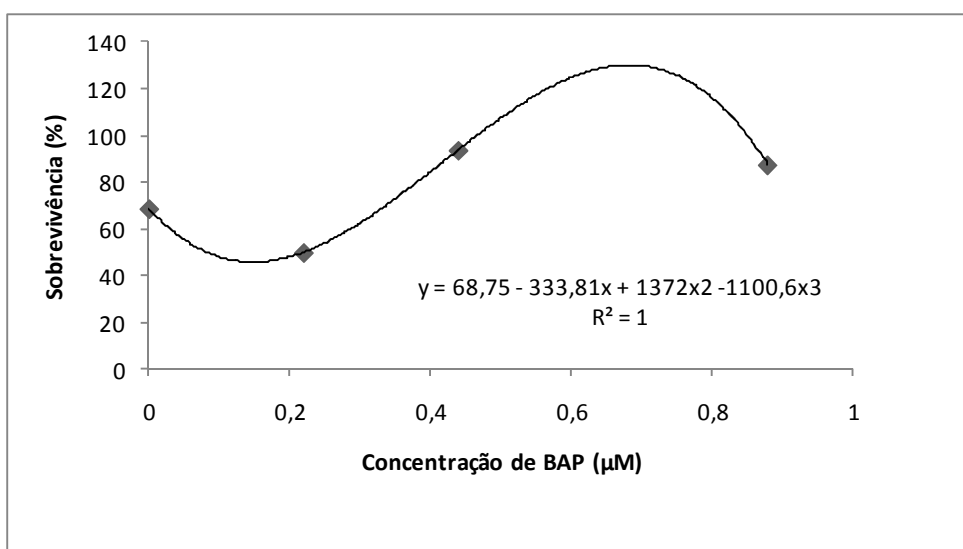


Figura 5 – Porcentagem de sobrevivência, aos 45 dias de cultivo, de segmentos nodais de *Luehea divaricata* (Mart. & Zucc.) cultivados *in vitro*, em meio WPM com diferentes níveis de concentração de BAP. UFSM, Santa Maria, RS, 2010.

Em relação ao efeito de ANA, não foi verificada diferença estatística entre sua presença e sua ausência no meio de cultivo, obtendo-se uma média geral de 75% de sobrevivência *in vitro*.

O estabelecimento dos segmentos nodais, igualmente, não foi afetado significativamente por BAP tampouco por ANA, registrando-se uma média de 70,31% de explantes estabelecidos, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Da mesma maneira, Flôres (2007), não observou efeito significativo para concentrações de BAP em relação ao estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de açoita-cavalo, observando uma média de 78,75%.

O número de brotos produzidos nos explantes de segmentos nodais de açoita-cavalo, não apresentou efeito significativo dos fatores principais, tampouco da

interação ANA*BAP, verificando-se uma média de 2,03 brotos por explante. Na Figura 6, pode-se observar a resposta dos explantes às concentrações dos fitorreguladores.

A produção de brotos, no presente trabalho, foi, relativamente, maior que àquela verificada por Flôres (2007), que registrou uma média de 1,06 brotos. Nascimento *et al.* (2008), em segmentos caulinares de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess) cultivados *in vitro* com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹), não verificaram diferenças significativas para o número médio de brotos, número de gemas, comprimento de brotações e número de folhas.

Em explantes de *Acacia mearnsii*, Borges Júnior *et al.* (2004), verificaram maior taxa de multiplicação de gema com 3,5 brotos por explante, utilizando 2 mg L⁻¹ de BAP. No entanto, Rosa (2009), testando o efeito de concentrações de BAP (0 a 10 µM) e ANA (0 e 2,2 µM) em meio MS sobre os segmentos nodais de *Mimosa scabrella*, provenientes de cultivo *in vitro*, registrou que a utilização de ANA não apresentou efeito nos explantes, e, na ausência de BAP, foi obtida a maior produção de novas gemas por explante.

Em segmentos de nó cotiledonar de plantas de cedro (*Cedrela fissilis*) germinadas *in vitro*, Amaral (2006), testou concentrações de 0 e 5 µM da citocinina BAP, registrando uma produção média de 2,7 brotos por explante.

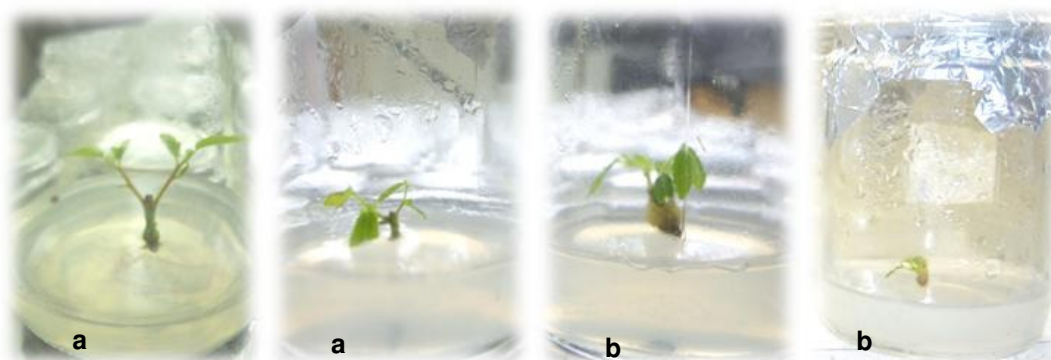


Figura 6 – Segmentos nodais de *Luehea divaricata* (Mart.& Zucc.) *in vitro*, com formação de novos brotos e folhas (a) e formação de brotos com calo na base (b), em diferentes níveis de concentração de BAP. UFSM, Santa Maria, RS, 2010.

Para o número de folhas, novamente, não se verificou diferença significativa entre os tratamentos, sendo obtida uma média de 3,84 folhas por explante. Flôres

(2007) registrou que, em média, foram produzidas 2,58 folhas por segmento nodal cultivado em meio WPM, suplementado com até 66,6 μ M de BAP.

Foi verificada uma diminuição no número brotações e no número de folhas, utilizando níveis crescentes de concentração da citocinina BAP em explantes caulinares de *Inga vera* Willd. (STEIN, 2007). Igualmente, Rosa (2009), verificou diminuição no número de folhas em bracatinga (*Mimosa scabrella*), com o aumento da concentração da citocinina BAP.

A porcentagem de formação de calos não apresentou diferença significativa entre as concentrações de BAP e ANA testadas. A média observada para essa variável foi de 29,69%. Em outro trabalho realizado com segmentos nodais de açoita-cavalo, foram obtidos 46,25%, em média, de formação de calos, entretanto, foram utilizadas concentrações mais elevadas de BAP (FLÔRES, 2007).

Rosa (2009) observou baixa formação de calos na ausência da citocinina BAP. Com o incremento na concentração deste fitorregulador (7,5 a 10 μ M), houve um aumento na formação de calos de até 70% em explantes de *Mimosa scabrella* Benth. Igualmente, Amaral (2006) verificou a formação de calos em 95% dos explantes de segmentos de nó cotiledonar de *Cedrela fissilis*, cultivados em meio WPM com adição de 5 μ M de BAP.

BAP e ANA não apresentaram influência significativa na rizogênese em açoita-cavalo, obtendo-se apenas 12,5% de formação de raízes, o que é desejável na etapa inicial de multiplicação *in vitro*. Provavelmente, as concentrações de BAP, adicionadas ao meio nutritivo, contribuíram para inibir a formação de raízes, uma vez que, as citocininas promovem um maior crescimento da parte aérea. Flôres (2007), somente observou enraizamento *in vitro* na ausência desta citocinina.

Em explantes de segmentos de nó cotiledonar de *Cedrela fissilis*, verificou-se a formação de raízes em 60-65% das brotações cultivadas em meios que continham as citocininas BAP ou cinetina (KIN) (AMARAL, 2006).

Os resultados obtidos permitem inferir que, de uma maneira geral, as concentrações de BAP e ANA testadas, não resultaram em um balanço hormonal adequado à promoção de respostas otimizadas na multiplicação *in vitro* de açoita-cavalo, a partir do cultivo de segmentos nodais. Contudo, as concentrações de BAP empregadas foram mais eficientes que àquelas utilizadas por Flôres (2007), de magnitude dez vezes maior. É possível que a inclusão de um número maior de níveis de ANA e/ou o aumento na concentração de BAP ou, ainda, a substituição por

outras auxinas e citocininas, permitam a otimização desses parâmetros relacionados à multiplicação *in vitro* de açoita-cavalo.

II – Calogênese, a partir de fragmentos foliares de açoita-cavalo

Para as notas atribuídas em relação à formação de calo nos fragmentos foliares de açoita-cavalo, foi verificada diferença significativa apenas para o efeito das concentrações de BAP, sendo possível o ajuste a uma curva quadrática (Figura 7).

A partir da equação obtida, estimou-se em 54,5 µM o ponto de máxima eficiência técnica (MET) para a calogênese, concentração em que seriam observadas ondulações nas bordas dos fragmentos foliares e reduzida formação de pequenos calos, como se pode verificar na Figura 8, reduzindo-se essa resposta com o aumento do nível de BAP.

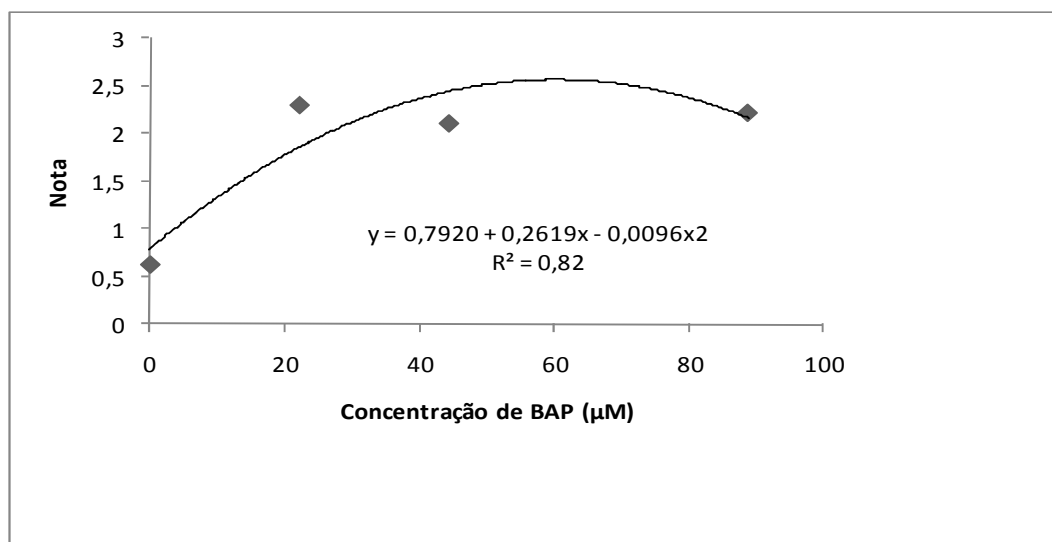


Figura 7 – Notas atribuídas à formação de calos em fragmentos foliares de *Luehea divaricata* (Mart. & Zucc.) cultivados *in vitro*, em meio WPM com diferentes concentrações de BAP, aos 45 dias de cultivo. UFSM, Santa Maria, RS, 2010.

A utilização de ANA não apresentou efeito significativo na nota de calos, verificando-se uma média geral de 1,84, denotando que muitos dos fragmentos foliares não formaram, nem sequer, ondulações nas bordas.

Não há registro de trabalhos testando a resposta calogênica de explantes foliares a fitorreguladores, isoladamente ou combinados, para açoita-cavalo, mas, Erig (2004), testando explantes foliares e entrenós de *Malus domestica* Borkh. em resposta a concentrações entre 0 e 27,2 μM de BAP e TDZ, concluiu que, para a organogênese *in vitro* dos explantes testados, o mais eficiente foi a folha acrescido com TDZ em concentrações entre 6,8 e 13,6 μM .

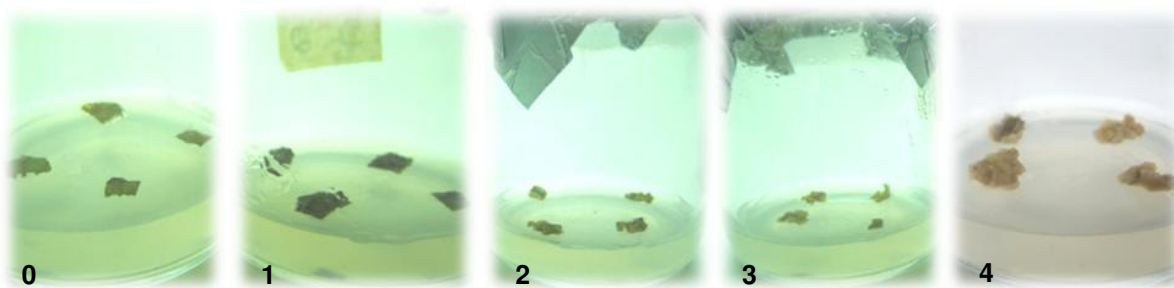


Figura 8 – Explantes foliares de *Luehea divaricata* (Mart. & Zucc.) *in vitro* com diferentes concentrações de BAP: explante oxidado e/ou contaminado (0); explante sem alterações morfológicas (1); explantes com bordas onduladas (2); explante com formação de pequenos calos (3); explante com calos totalmente formados (4). UFSM, Santa Maria, RS, 2010.

Enquanto, em explantes foliares de *Salix humboldtiana*, Santos *et al.* (2005), testaram o efeito de combinações de 2-4 D (0 a 12 mg L^{-1}) e combinações de ANA e BAP em concentrações entre 0 e 8 mg L^{-1} , verificando produção de calos friáveis na presença de 6 mg L^{-1} de 2-4 D, e que a utilização de ANA ou BAP, além de induzir calogênese, também foi capaz de promover rizogênese.

Para a formação de calo, também foi verificada diferença significativa entre as concentrações de BAP, mas não para ANA, nem para a interação entre os dois fitorreguladores. Para a auxina, foi registrada uma média de 44,01% de formação de calos. Em relação à BAP, a formação de calos ajustou-se a um modelo de segundo grau (Figura 9), em que o ponto de máxima eficiência técnica (MET) ocorreria em 54,01 μM dessa citocinina, reduzindo-se a calogênese, a partir dessa concentração.

O balanço entre auxinas e citocininas desempenha um papel fundamental na resposta *in vitro* do explante, assim, é possível que, concentrações mais elevadas de BAP e/ou de ANA, ou, até, a utilização de outras citocininas ou auxinas, proporcionem o estímulo necessário para a obtenção de uma maior calogênese. Há que se considerar, também, que, talvez, o explante utilizado não tenha sido o mais adequado, uma vez que as citocininas, naturalmente, possuem uma baixa mobilidade nas folhas (HINOJOSA, 2000).

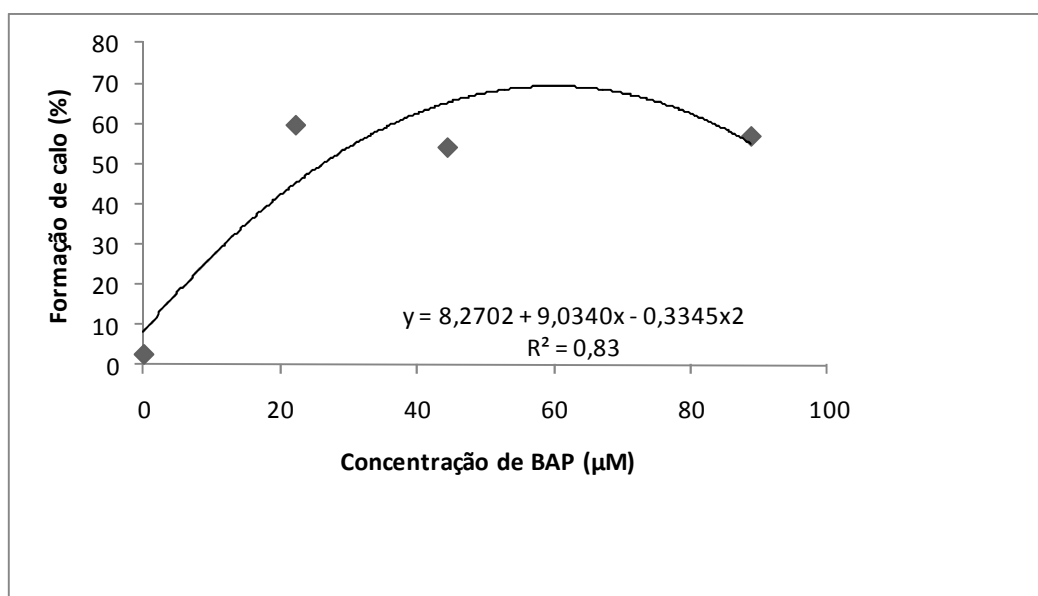


Figura 9 – Calos formados (%) em fragmentos foliares de *Luehea divaricata* (Mart. & Zucc.) cultivados *in vitro*, em meio WPM com diferentes concentrações de BAP, aos 45 dias de cultivo. UFSM, Santa Maria, RS, 2010.

A ausência de efeito significativo de ANA sobre a formação de calos em fragmentos foliares de açoita-cavalo pode ser decorrente de que as concentrações utilizadas terem resultado baixas para estimular respostas favoráveis à calogênese na espécie. O emprego de concentrações mais elevadas desse fitorregulador ou de outras auxinas poderia otimizar a calogênese.

Para o número médio de calos, da mesma maneira que para as demais variáveis analisadas, houve efeito significativo, apenas para o fator principal BAP. Utilizando-se ANA, a média geral foi de 1,76 calos. Houve o ajuste das médias a uma curva quadrática (Figura 10), em que a máxima eficiência técnica (MET)

ocorreria em 58,14 μM de BAP, decrescendo o número de calos em fragmentos foliares de açoita-cavalo, a partir desse ponto.

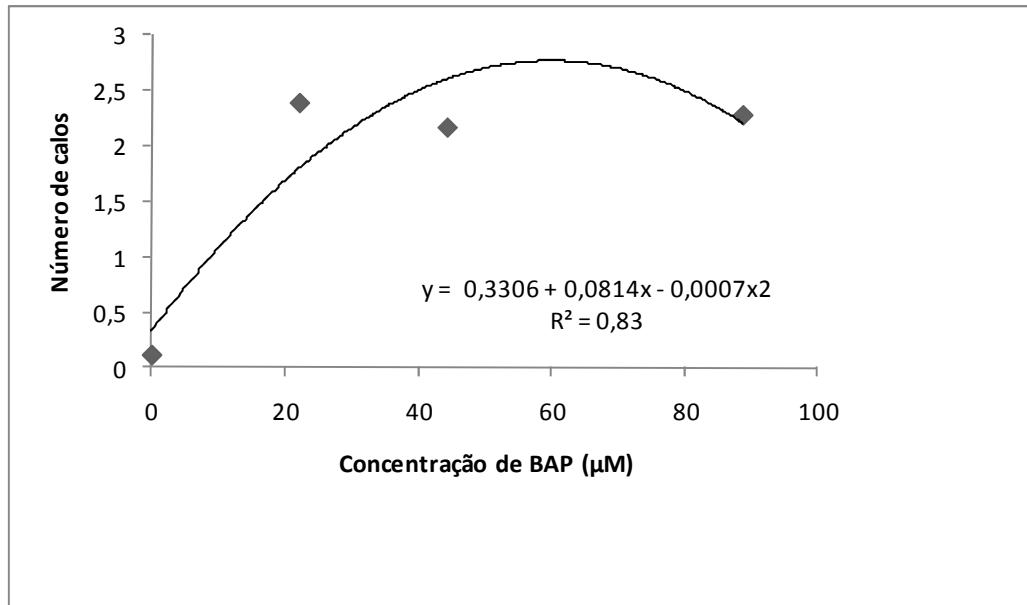


Figura 10 – Número médio de calos formados em fragmentos foliares de *Luehea divaricata* (Mart. & Zucc.) cultivados *in vitro*, em meio WPM com diferentes concentrações de BAP, aos 45 dias de cultivo. UFSM, Santa Maria, RS, 2010.

5.3 Conclusões

As concentrações de BAP e ANA testadas não resultaram em um balanço hormonal adequado à promoção de respostas otimizadas na multiplicação *in vitro* de açoita-cavalo, a partir do cultivo de segmentos nodais.

A presença de BAP influencia, significativamente, a calogênese em fragmentos foliares de açoita-cavalo.

A auxina ANA não afeta a formação de calos em fragmentos foliares de açoita-cavalo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Trabalhos adicionais devem ser realizados no sentido de aperfeiçoar a desinfestação superficial de sementes de açoita-cavalo, permitindo a obtenção de um número maior de culturas assépticas para dar continuidade a outras etapas da cultura de tecidos.

Obteve-se êxito no estabelecimento *in vitro* de açoita-cavalo a partir do cultivo de segmentos apicais e segmentos nodais, podendo ser empregado qualquer um deles.

As concentrações de BAP e ANA testadas, não resultaram em um balanço hormonal adequado à promoção de respostas otimizadas na multiplicação *in vitro* de açoita-cavalo, a partir do cultivo de segmentos nodais, devendo ser realizados outros trabalhos, testando diferentes fontes de citocinina e auxina.

Observou-se resposta satisfatória dos fragmentos foliares de açoita-cavalo à calogênese. Contudo, devem ser testadas concentrações mais elevadas de BAP e, principalmente de ANA, ou outras fontes de citocinina e auxina devem ser avaliadas com o objetivo de aumentar a formação de calos em açoita-cavalo.

Finalmente, os estudos que visam contribuir para a micropropagação em açoita-cavalo devem prosseguir, já que a espécie apresenta entraves para a propagação por sementes que podem ser superadas pela cultura de tecidos. A produção de mudas *in vitro* poderá contribuir para a recuperação das populações naturais e para a exploração sustentável de florestas plantadas, compostas por indivíduos de elevada qualidade genética, fisiológica e sanitária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, V. F. M. **Multiplicação *in vitro* de *Cedrella fissilis* Vell.** 2006. 60 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.

ASSIS, T. F. de; 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.** Brasília: Embrapa, 1998. v. 1, p. 261-296.

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

BEVILACQUA, C. B. **Germinação e cultivo *in vitro* de *Calendula officinalis* L.** 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2009.

BONGA, J. M.; ADERKAS. **In vitro culture of trees.** Boston: Kluwer Academic Publishers, 1992. v. 2.

BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry.** Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. v. 3.

BORGES JÚNIOR, N.; SOBORSA, R. C.; CODER, M. P. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia-negra (*Acacia mearnsii* de Willd.), **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 004, p. 493 – 497, 2004.

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

CABONI, E.; LAURI, P.; D'ANGELI, S. In vitro plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. **Plant Cell Reports**, New York, v.19, p. 755–760, 2000.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v. 1, p. 87 – 132.

CAMARGO, J. T. et. al. Efeito do escuro e do seccionamento de internódios do porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido, na calogênese *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5, n. 2, p. 81-83, 1999.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Florestais Brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa, 1994. 640 p.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxygala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2003.

ERIG, A. C. **Estabelecimento *in vitro*, multiplicação, organogênese e transformação genética de cultivares de macieira (*Malus domestica* Borkh.)**. 2004 Tese, 89 f (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2004.

FARIAS, J. A. **Contribuição para a silvicultura de *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini (açoita-cavalo)**. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FLOH, E. I. S.; HANDRO, W. Variation of histological patterns in tobacco callus during successive subcultures. **Canadian Journal of Botany**, v. 63, p.1794 – 1800, 1985.

FLORES, R.; MALDAMER, J.; NICOLOSO, F. T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa*. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, Santa Maria, 2006.

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

FRANZIN, S.; PARANHOS, J.; MACHADO, A. Obtenção de brotações aéreas *in vitro* de *Rollinia salicifolia*. **Revista Brasileira Agrociencia**, v. 10, n. 3, p. 132 – 133, jan./mar. 2004.

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

HINOJOSA, G. F. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 15 – 48.

JÚNIOR, A. G. et. al. Efeito de fungicidas aplicados nas sementes na emergência de plântulas de erva mate (*Ilex paraguariensis*), **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 39, p. 31 – 39, julho/dez. 1999.

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

KUNEIDA, M. K.; KERBAUY, G. B. Formação de gemas em raízes adventícias de couve-flor cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, n. 9, p. 231 – 238, 1986.

LONDE, N. L. Efeito do Benomyl e identificação de fitopatogenos em meio MS para o controle da contaminação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae), **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 94-100, julho/set. 2007.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montains laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined 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. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 368 p.

_____. *Mimosa scabrella*. In: **Árvores brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 2002. v. 1.

MANTOVANI, N. C. **Estudo da regeneração *in vitro* de caixeta** (*Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. 1997. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 1997.

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, C. R. et al. Calogênese de tecido foliar de porta-enxerto de macieira m.7 (*Malus* sp.) induzida por BAP e CPPU. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 23, n. 3, p. 714 – 717, dez. 2001.

McKELLAR, D. S.; HERMAN, B.; WATT, M. P. Towards a Protocol for the Micropropagation of *Pinus patula*. **Suid-Afrikaanse Bosboutydskrif**, n. 171, 1994.

NASCIMENTO, A. C. et. al. BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Eugenia pyriformes* Cambess, Ver. Acad. **Ciência Agrária Ambiental**, Curitiba, v. 6, n. 2, p. 223 – 228, abr./junho 2008.

OLIVEIRA, L. M.; DAVIDE, A. C.; CARVALHO, M. L. M.; Avaliação de métodos para quebra de dormência e para desinfestação de sementes de canafistula (*Peltophorum dubium*). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 5, p. 597 – 603, 2003.

PACHECO, J. P. **Estaquia de *Luehea divaricata* Mart (açoita-cavalo)**. 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2007.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 40 p.

PEDROSO, O.; MATOS, J. R. **Estudo sobre madeiras do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Companhia Rio-Grandense de Artes Gráficas, 1987. 185 p.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Herbário Barbosa Rodrigues; Secretaria da Agricultura e Abastecimento-DRNR, 1988. 525 p.

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

RICHTER, H. G.; DALLWITZ, M. J. Commercial timbers: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. In: ENGLISH, French, German, Portuguese, and Spanish. Version: 16th April 2006. Disponível em: <<http://delta-intkey.com>> Acesso em: 22 nov. 2009.

ROCHA, S. C.; QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese de mogno (*Swietenia macrophylla* King.) cultivados *in vitro*. **Ciência florestal**, Santa Maria, RS, v. 14, n. 1, p. 91 – 101, 2004.

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

SANTOS, B. R. et al. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd), **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 35, n. 3, maio/junho 2005.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T., ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação, **Cerne**, Lavras, MG, v. 7, n. 2, p. 117 – 123, 2001.

SCOTTI, M. S. 2009. **Mecanismos de regeneração natural em remanescente de floresta estacional decidual, Santa Maria, RS**. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2009.

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

SITA, G. L. Progress towards the *in vitro* clonal propagation of *Eucalyptus grandis*. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. **Plant tissue culture and its agricultural applications**. Butterworths: Cambridge, 1986. p. 159 – 186.

SOBRAL, M. et al. **Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. São Paulo: Rima/Novo Ambiente, 2006. 350 p.

STEIN, V. C. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, RS, v. 5, p. 723 – 725, julho 2007. Supl. 2.

STUDART-GUIMARÃES, C. et al. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 13, n. 1, p. 167-178, 2003.

TAIZ, L; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TANAKA, J. et al. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 834 – 837, 2005.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Brasília, DF: Embrapa: CENARGEN, [20--?]. Disponível em: http://www.redbio.org/porta/encuentros/enc_2001/simposios/S-06/Joa%20Batista%20Teixeira/Palestra%20-0Jo%E3o%20Batista%20Teixeira.pdf. Acesso em: 01 out. 2008.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2005. 182 p.

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

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

_____. **Glossário de Biotecnologia vegetal**, Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: EMBRAPA, 2000. 128 p.

TOZZI, H. H; SOUZA, P. R. M.; TAKAKI, M. Efeito toxico do mercúrio na germinação de sementes de duas espécies de Asteraceae (*Galingosa parviflora* Cav. e *Bidens pilosa*). **Bioscience Journal**. Uberlândia, MG, v. 23, n. 3, p. 94 – 100, July/Sept. 2007.

VIEIRA, F. A.; GUSMÃO, E. Efeito de giberelinas, fungicidas e do armazenamento na germinação de sementes de *Genipa americana* L. (*Rubiaceae*), **Cerne**, Lavras, MG, v. 12, n. 2, p. 137 – 144, abr./junho 2006.

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

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. **Biotechnologia florestal**. Viçosa, MG, p. 57 – 74, 2007.

YAMAZAKI, E. Considerações sobre cultura de tecidos em espécies lenhosas. In: XAVIER, A.; WENDLING, I.; DA SILVA, R. L. **Silvicultura clonal**: principios e técnicas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. p. 152 – 209.

ANEXOS

Anexo A – Tabela dos sais presentes no meio de cultivo Woddy Plant Medium – WPM (Lloyd e Mc Cown, 1981).

Concentração de sais		
Composto	Fórmula Química	Concentração (mg L ⁻¹)
MACRONUTRIENTES		
Nitrato de Amônia	NH ₄ NO ₃	400
Cloreto de Cálcio	CaCl ₂ . 2H ₂ O	96
Sulfato de Potásio	K ₂ SO ₄	990
Sulfato de Magnésio	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
Fosfato de Potásio	KH ₂ PO ₄	170
Nitrato de Cálcio	Ca(NO ₃). 4H ₂ O	556
MICRONUTRIENTES		
Sulfato de Manganês	MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	6,2
Sulfato de Zinco	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6
Molibdato de Sódio	NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,25
Sulfato de Ferro II	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8
Sódio EDTA	Na ₂ . EDTA. 2H ₂ O	37,2
CARBOIDRATOS, VITAMINAS, ADITIVOS		
Glicina	---	2,0
Tiamina. HCL	---	1,0
Ácido Nicotínico	---	0,5
Piridoxina. HCL	---	0,5
Mioinositol	---	100

Fonte: Xavier *et al.* (2009).