

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

**CULTIVO *IN VITRO* DE *Peltophorum dubium*
(SPRENGEL) TAUBERT: MULTIPLICAÇÃO,
SENECÊNCIA FOLIAR E CALOGÊNESE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Danieli Ferneda Candido

Santa Maria, RS, Brasil

2013

CULTIVO *IN VITRO* DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT: MULTIPLICAÇÃO, SENESCÊNCIA FOLIAR E CALOGÊNESE

Danieli Ferneda Candido

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

2013

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

Candido, Danieli Ferneda
CULTIVO IN VITRO DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL)
TAUBERT: MULTIPLICAÇÃO, SENESCÊNCIA FOLIAR E CALOGÊNESE
/ Danieli Ferneda Candido.-2013.
120 p.; 30cm

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2013

1. Auxinas 2. Citocininas 3. Espécie florestal 4.
Micropropagação I. Reiniger, Lia Rejane Silveira II.
Título.

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

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

**CULTIVO *IN VITRO* DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL)
TAUBERT: MULTIPLICAÇÃO, SENESCÊNCIA FOLIAR E
CALOGÊNESE**

elaborada por
Danieli Ferneda Cândido

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

Comissão Examinadora:

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

Candida Elisa Manfio, Dr^a (UNICRUZ)

Diego Pascoal Golle, Dr. (UNICRUZ)

Maristela Machado Araújo, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 20 de fevereiro de 2013.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Irineu e Elaine e ao meu esposo Andre,
por todo o apoio, carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as conquistas, pela proteção que tenho recebido e por me dar forças para concluir esse trabalho.

Aos meus pais, pelos quais tenho muito orgulho, agradeço pelo amor incondicional, pelo incentivo, por todos os conselhos e ensinamentos que contribuíram para a construção do meu caráter e, principalmente, por compreenderem a minha ausência.

Ao meu esposo, por todo seu amor, carinho, força, dedicação e apoio, pela compreensão nas ocasiões em que estive distante e pelo incentivo nos momentos difíceis.

Às minhas irmãs, Alexsandra e Tatiane e aos meus cunhados, Reginaldo e Rodrigo, pelo amor, carinho, amizade e por todos os momentos felizes que me proporcionaram.

Ao meu amado sobrinho e afilhado Gabriel, presente de Deus que veio trazer mais alegria à minha vida.

À minha orientadora, professora Dr^a Lia Rejane Silveira Reiniger, pelo exemplo como pessoa e profissional. Obrigada pelos seus ensinamentos, pela oportunidade, por contribuir nesta etapa da minha vida e pela paciência incondicional.

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

À colega Aline Curti, pela amizade, pelos seus ensinamentos, pela ajuda nos experimentos, pela paciência e disposição para ajudar na construção do meu trabalho e, principalmente, por todos os momentos bons que passamos juntas. Muito Obrigada!

À colega Aline Paim, pela amizade, carinho, pela sua ajuda nos experimentos, pelos momentos de companheirismo, pelas conversas e por todos os momentos divertidos e alegres em que estivemos juntas. Muito Obrigada!

Ao colega Enrique León, pela amizade, pelo carinho, risadas, pelas dicas e contribuição no meu trabalho.

Aos demais colegas de laboratório, Leonardo, Iana, Jaque, Karol, Charlene, Júlio, Clarissa, Carla Moro, Silvia, Carla Paes, Marta, Victória e Marcelo, pela ajuda quando necessária, pela convivência e amizade.

À Rone, atual secretária do PPGEF e à Tita, ex-secretária do PPGEF, por toda ajuda, esclarecimento prestados e, também, pela paciência.

Às queridas Lílian e Juliana, muito obrigada pela amizade, carinho e apoio.

Sinceramente, quero agradecer a todos por terem me acolhido tão bem e por tornarem a minha vida mais alegre, vocês foram fundamentais na construção deste trabalho.

Muito obrigada!

"Não há transição que não implique um ponto de partida, um processo e um ponto de chegada. Todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje. De modo que o nosso futuro baseia-se no passado e se corporifica no presente. Temos de saber o que fomos e o que somos para sabermos o que seremos."

Paulo Freire

RESUMO

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

CULTIVO *IN VITRO* DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT: MULTIPLICAÇÃO, SENESCÊNCIA FOLIAR E CALOGÊNESE

AUTORA: DANIELI FERNEDA CANDIDO
ORIENTADORA: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 20 de fevereiro de 2013.

Peltophorum dubium (Sprengel) Taubert é uma espécie florestal nativa com muitas possibilidades de uso e com grande potencial para plantios comerciais. No entanto, há poucas informações sobre a produção de mudas desta espécie, o que, aliado às limitações inerentes às espécies arbóreas, dificulta a implantação de programas de melhoramento genético e, consequentemente, o estabelecimento de povoamentos de adequada qualidade genética. Estudos relacionados à propagação de *Peltophorum dubium* por técnicas da cultura de tecidos *in vitro* podem auxiliar nesse sentido. Considerado o exposto, o presente estudo objetivou avaliar o efeito de fontes, concentrações e combinações de fitorreguladores na multiplicação e senescência foliar *in vitro* de *Peltophorum dubium*. Adicionalmente, procurou-se estudar a resposta de diferentes explantes em relação à organogênese indireta, que pode ser uma maneira alternativa para a indução de órgãos. Na multiplicação *in vitro* e na senescência foliar *in vitro* foram avaliadas diferentes fontes e concentrações das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (CIN), isopenteniladenina (2iP) e thidiazuron (TDZ), combinadas entre si, ou isoladas, bem como sua associação com ácido α-naftalenoacético (ANA) e, no caso de CIN, 2iP e TDZ, com BAP. Na organogênese indireta, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e diferentes explantes cultivados na presença ou ausência de luz. Pode-se concluir que o emprego da citocinina 2iP, nas concentrações testadas, na presença de ANA ou em conjunto com ANA e BAP, não exerce influência na multiplicação *in vitro* de epicótilos contendo o nó cotiledonar de *Peltophorum dubium*. Ainda, aos 21 dias de cultivo *in vitro*, em condições de temperatura elevada, ocorre expressiva senescência foliar. As citocininas BAP, CIN, TDZ e 2iP, nas concentrações testadas, não influenciam na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*. Verificou-se que, quando se utiliza TDZ, é dispensável a utilização de ANA para que se mantenha controlada a senescência foliar, no entanto, quando é 2iP, a presença de ANA contribui para a redução no número de folhas senescentes. De maneira geral, a partir dos 21 dias de cultivo *in vitro*, a auxina e as citocininas utilizadas (ANA, 2iP e TDZ) passam a exercer efeito significativo na ocorrência de senescência foliar, a qual vai depender da combinação dos fitorreguladores. Pode-se verificar, também, que a presença de TDZ, ANA e 2iP, nas concentrações testadas, não exerce influência na sobrevivência, estabelecimento e número de folhas formadas em *Peltophorum dubium* durante o cultivo *in vitro* inicial de epicótilos contendo o nó cotiledonar, observando-se elevadas médias para estas variáveis. Ainda, a associação entre ANA e TDZ tem efeito prejudicial significativo na sobrevivência *in*

vitro de explantes de *Peltophorum dubium* durante o primeiro subcultivo de 30 dias. Esta associação também tem efeito prejudicial significativo no estabelecimento *in vitro* e número de brotos formados em segmentos apicais caulinares de *Peltophorum dubium* durante o primeiro subcultivo de 30 dias. A presença de 2iP e ANA, nas concentrações testadas, não exerce influência na sobrevivência, estabelecimento, número de brotos e número de folhas formados em *Peltophorum dubium* durante o primeiro subcultivo de 30 dias. A calogênese é maximizada na presença de 20 μM de 2,4-D em segmentos cotiledonares e hipocótilos. Na ausência de 2,4-D os hipocótilos são mais eficientes na calogênese. Observam-se altas porcentagens de oxidação fenólica, mas de maneira geral, as oxidações não inviabilizam a formação de calos, principalmente em segmentos cotiledonares e hipocótilos. Ocorrem 100% de formação de raízes em segmentos cotiledonares, na presença de luz e em meio nutritivo suplementado com 40 μM de 2,4-D; na ausência de luz e presença de 20 μM da auxina, a rizogênese é também satisfatória.

Palavras-chave: Auxinas. Citocininas. Espécie florestal. Micropropagação.

ABSTRACT

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

IN VITRO CULTURE OF *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT: MULTIPLICATION, LEAF SENESCENCE AND CALLOGENESIS

AUTHOR: DANIELI FERNEDA CANDIDO
ADVISOR: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER
Date and Place of Defense: Santa Maria, February 20th, 2013.

Peltophorum dubium (Sprengel) Taubert is a native forest species with many possible uses, with great potential for commercial plantations. However, there is little information on the production of seedlings of this species, which, together with the inherent limitations of tree species, impedes the setting of breeding programs and, therefore, the establishment of stands of appropriate genetic quality. Studies related to the *Peltophorum dubium* propagation by tissue culture techniques can help in this regard. Therefore, this study aimed to evaluate methodologies for *in vitro* culture of *Peltophorum dubium*, with the specific purpose of increasing rates of multiplication of the species and reduce leaf senescence. Furthermore, we tried to establish an efficient methodology for the indirect organogenesis, which can be an alternative way to induce organs. On *in vitro* multiplication and leaf senescence were investigated different sources and concentrations of cytokinins 6-benzylaminopurine (BAP), kinetin (KIN), isopentenyladenine (2iP), and thidiazuron (TDZ), combined one with each other, or isolated, and its association with α -naphthaleneacetic acid (NAA) and in the case of kinetin, 2iP and TDZ, also with BAP. In indirect organogenesis, we evaluated the effect of different concentrations of 2,4-D and various explants cultured in the presence or absence of light. It can be concluded that the use of cytokinin 2iP, in the evaluated concentrations in the presence of NAA or in association with NAA and BAP, has no effect on *in vitro* multiplication of the epicotyls containing cotyledonary node of *Peltophorum dubium*. Further, after 21 days of *in vitro* culture, under conditions of high temperature, occurs expressive leaf senescence. Cytokinins BAP, KIN, 2iP and TDZ, in evaluated concentrations, do not influence the *in vitro* multiplication of *Peltophorum dubium*. To maintain controlled leaf senescence when TDZ is used is dispensable using NAA, however, when the cytokinin 2iP is employed, the presence of NAA contributes to a reduction in the number of senescent leaves. Generally, from 21 days of *in vitro* culture the auxin and cytokinins used (NAA, 2iP and TDZ) start to have a significant effect on the occurrence of leaf senescence, which will depend on the combination of growth regulators. Can be also checked that the presence of TDZ, 2iP and NAA at the concentrations tested have no influence on survival, establishment and number of leaves formed in *Peltophorum dubium* during the initial *in vitro* culture of epicotyls containing cotyledonary node, have been observed high averages for these variables. Furthermore, the combination of NAA and TDZ has significant deleterious effect on *in vitro* survival of *Peltophorum dubium* explants during the first 30 days of subculture. This association also has significant

deleterious effect on *in vitro* establishment and number of new shoots in shoot apical segments during first 30 days of subculture of *Peltophorum dubium*. The presence of 2iP and NAA at the concentrations tested doesn't have influence on survival, establishment, number of shoots and number of leaves formed in *Peltophorum dubium* during the first subculture of 30 days. The callogenesis is maximized in the presence of 20 μ M of 2.4-D in cotyledon and hypocotyl segments. In the absence of 2.4-D hypocotyl are more efficient in callus formation. There is a high phenolic oxidation, but that, in general, does not impair the formation of callus, mainly in hypocotyls and cotyledon segments. There are 100% of root formation in cotyledon segments in the presence of light and nutritive medium supplemented with 40 μ M of 2.4-D; in the absence of light and in the presence of 20 μ M auxin rooting is also satisfactory.

Keywords: Auxins. Cytokinins. Forest species. Micropropagation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Fonte de explantes e tipo de explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert utilizados nos ensaios de multiplicação *in vitro*. A) Planta germinada *in vitro* com círculo indicando o epicótilo e B) Epicótilo contendo o nó cotiledonar. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. 40
- Figura 2 - Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS suplementado com diferentes concentrações de isopenteniladenina (2iP) (a 0; 5; 10 ou 20 μ M) na presença de 0,05 μ M de ácido α -naftalenoacético (ANA) apresentando vitrificação (A), calo (B) e clorose foliar (C). Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. 45
- Figura 3 - Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 21 dias de cultivo, em meio nutritivo MS suplementado com diferentes concentrações de isopenteniladenina (2iP) (a 0; 5; 10 ou 20 μ M) na presença de 0,05 μ M de ácido α -naftalenoacético (ANA) apresentando sinais de senescência foliar. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. 47
- Figura 4 - Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo MS, em diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) sem sinais de folhas senescentes, aos sete dias de cultivo *in vitro*. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. 57
- Figura 5 - Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo MS, suplementado com 10 μ M de thidiazuron (TDZ), apresentando folhas com sinais de senescência, aos 21 dias de cultivo *in vitro*. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. 57
- Figura 6 - Fonte de explantes e tipos de explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert utilizados no ensaio de calogênese. A) Planta resultante de germinação *in vitro*, com círculos indicando os explantes e 1B) Segmento cotiledonar; 2B) Segmento radicular e 3B) Hipocótilo. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. 95
- Figura 7 - Calos formados em segmentos cotiledonares (A) e hipocótilos (B) de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), na presença ou ausência de luz. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. 97
- Figura 8 - Porcentagem de formação de calos em diferentes explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), na presença ou ausência de luz. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. 97

- Figura 9 - Segmentos radiculares de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), na presença ou ausência de luz, apresentando oxidação fenólica. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. 102
- Figura 10 - Porcentagem de oxidação fenólica em explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), na presença ou ausência de luz. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. 102
- Figura 11 - Raízes formadas em segmentos cotiledonares de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), na presença ou ausência de luz. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. 105
- Figura 12 - Formação de raízes (%) em explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), na presença de luz. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. 107
- Figura 13 - Formação de raízes (%) em explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), na ausência de luz. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de formação de calos, em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (CIN), isopenteniladenina (2iP) ou thidiazuron (TDZ). Santa Maria, UFSM, RS, 2013.	51
Tabela 2 - Porcentagem de folhas com sinais de senescência, em explantes de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert, ao longo de 42 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (CIN), isopenteniladenina (2iP) ou thidiazuron (TDZ). Santa Maria, UFSM, RS, 2013.	53
Tabela 3 - Número de folhas com sinais de senescência, em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert, ao longo de 28 dias de cultivo em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) e ácido α -naftalenoacético (ANA). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.	55
Tabela 4 - Número de folhas com sinais de senescência, em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo MS, em função de diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) e do período de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.	56
Tabela 5 - Número de folhas com sinais de senescência, em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> cultivadas em meio nutritivo MS, em função de diferentes concentrações de ácido α -naftalenoacético (ANA) e do período de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.	59
Tabela 6 - Número de folhas com sinais de senescência, em brotações de <i>Peltophorum dubium</i> cultivadas em meio nutritivo MS, em função de diferentes concentrações de ácido α -naftalenoacético (ANA), isopenteniladenina (2iP) e do período de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.	61
Tabela 7 - Porcentagem de sobrevivência de explantes de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de subcultivo, em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) e ácido α -naftalenoacético (ANA). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.	77
Tabela 8 - Porcentagem de estabelecimento de segmentos apicais caulinares e segmentos nodais de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de subcultivo, em meio nutritivo MS suplementado com diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) e ácido α -naftalenoacético (ANA). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.	79
Tabela 9 - Número de brotos por explante (NB ⁰ /E) em segmentos apicais caulinares e segmentos nodais de <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel)	

Taubert, aos 30 dias de subcultivo, em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) e ácido α -naftalenoacético (ANA). Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 80

Tabela 10 - Porcentagem de formação de calos em diferentes explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), na presença ou ausência de luz. Santa Maria, RS, UFSM, 2013..... 100

Tabela 11 - Porcentagem de oxidação fenólica em explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), na presença ou ausência de luz. Santa Maria, RS, UFSM, 2013. 103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM	– Micromolar (10^{-6} M)
$\frac{1}{2}$ MS	– Metade da concentração de sais do meio nutritivo elaborado por Murashige & Skoog (1962)
$\frac{1}{2}$ WPM	– Metade da concentração de sais do “Wood Plant Medium”, meio nutritivo elaborado por Lloyd & McCown (1981)
2,4-D	– ácido 2,4-diclorofenoxyacético
2iP	– 2-isopenteniladenina
AIA	– ácido 3-indolacético
AIB	– ácido 3-indolbutírico
ANA	– ácido α -naftalenoacético
AS	– acurácia seletiva
atm	– Atmosfera
BAP	– 6-benzilaminopurina [N-(Phenylmethyl)-1H-purin-6-amina]
CIN	– cinetina (N6- furfuryladenine)
GA ₃	– ácido giberélico ((3S,3aS,4S,4aS,7S,9aR,9bR,12S)-7,12-dihydroxy-3-methyl-6-methylene-2-oxoperhydro-4a,7-methano-9b,3-propeno[1,2-b]furan-4-carboxylic acid)
MET	– Máxima Eficiência Técnica
MS	– Meio nutritivo elaborado por Murashige & Skoog (1962)
NaOCl	– Hipoclorito de sódio
p	– Probabilidade
m/v	– Massa/volume
pH	– Potencial de hidrogênio
R ²	– Coeficiente de determinação
TDZ	– thidiazuron (N-fenil-N-1,2,3-thidiazol-5-ureia)
TM	– Taxa de Multiplicação
v/v	– Volume/volume
WPM	– “Wood Plant Medium”, meio nutritivo elaborado por Lloyd & McCown (1981)
ZEA	– zeatina [6-(4-hidroxi-3metilbut-2-enil) aminopurina]

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	25
2 REVISÃO GERAL.....	27
2.1 Descrição da espécie <i>Peltophorum dubium</i> (Sprengel) Taubert	27
2.2 Cultura de tecidos vegetais: micropropagação.....	28
2.2.1 Reguladores de crescimento vegetal	30
2.2.2 Multiplicação <i>in vitro</i>	31
2.2.3 Senescência foliar	32
2.2.4 Calogênese	33
3 CAPÍTULO I - EFEITO DE DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE FITORREGULADORES NA MULTIPLICAÇÃO E NA SENESCÊNCIA FOLIAR <i>IN VITRO</i> DE <i>Peltophorum dubium</i> (SPRENGEL) TAUBERT	35
3.1 Resumo	35
3.2 Abstract.....	36
3.3 Introdução	37
3.4 Material e métodos	38
3.4.1 Efeito de 2-isopenteniladenina (2iP) em presença de ácido α -naftalenoacético (ANA) na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i>	40
3.4.2 Efeito de 2iP em presença de ANA e 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i>	41
3.4.3 Efeito das fontes e concentrações de citocininas na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i>	41
3.4.4 Efeito de thidiazuron (TDZ) e ANA na senescência foliar <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i>	41
3.4.5 Efeito de 2iP e ANA na senescência foliar <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i>	42
3.5 Variáveis analisadas	42
3.6 Análise estatística	43
3.7 Resultados e discussões.....	43
3.7.1 Efeito de 2iP em presença de ANA na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i>	43
3.7.2 Efeito de 2iP em presença de ANA e BAP na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i>	47
3.7.3 Efeito das fontes e concentrações de citocininas na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i>	49
3.7.4 Efeito de TDZ e ANA na senescência foliar <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i>	54
3.7.5 Efeito de 2iP e ANA na senescência foliar <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i>	58
3.8 Conclusões	62
3.9 Referências bibliográficas.....	63
4 CAPÍTULO II - EFEITO DE DIFERENTES FITORREGULADORES E EXPLANTES NA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Peltophorum dubium</i> (SPRENGEL) TAUBERT	69
4.1 Resumo	69
4.2 Abstract.....	70
4.3 Introdução	71
4.4 Material e métodos	72

4.4.1 Efeito de thidiazuron (TDZ), ácido α -naftalenoacético (ANA) e diferentes explantes na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i>	73
4.4.2 Efeito de 2-isopenteniladenina (2iP), ANA e diferentes explantes na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i>	73
4.5 Variáveis analisadas.....	74
4.6 Análise estatística.....	74
4.7 Resultados e discussão	75
4.7.1 Efeito de TDZ, ANA e diferentes explantes na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i>	75
4.7.2 Efeito de 2iP, ANA e diferentes explantes na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Peltophorum dubium</i>	82
4.8 Conclusões	86
4.9 Referências	87
5 CAPÍTULO III - INDUÇÃO À CALOGÊNESE EM <i>Peltophorum dubium</i> (SPRENGEL) TAUBERT: EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D, LUMINOSIDADE E DIFERENTES EXPLANTES.....	91
5.1 Resumo.....	91
5.2 Abstract	92
5.3 Introdução	93
5.4 Material e métodos	94
5.5 Resultados e discussão	96
5.6 Conclusões	110
5.7 Referências	110
CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
REFERÊNCIAS	114

1 INTRODUÇÃO GERAL

Para a grande maioria das espécies florestais nativas do Brasil, os estudos que visam entender os fatores fisiológicos, genéticos e ambientais que exercem influência desde a formação da semente até a árvore adulta, ainda são incipientes. No entanto, devido à grande demanda pelos produtos de origem florestal, o interesse pelas espécies nativas tem sido cada vez mais frequente. Contudo, uma vez que se busca no setor florestal não somente quantidade, mas, também, a qualidade do produto final, tem-se observado maior uso das ferramentas biotecnológicas, em especial da cultura de tecidos, a fim de alcançar avanços nos estudos relacionados a essas espécies.

Peltophorum dubium (Sprengel) Taubert, por ser uma espécie nativa de rápido crescimento, é recomendada para reflorestamentos mistos de áreas degradadas e para o paisagismo, podendo, também, ser utilizada na construção civil e marcenaria devido à resistência moderada da sua madeira ao apodrecimento. A produção de mudas em larga escala e de elevada qualidade de *Peltophorum dubium* pode ser efetuada por meio da micropropagação, uma técnica da cultura de tecidos. Todavia, as informações referentes à propagação vegetativa *in vitro* desta espécie são escassas, o que justifica a realização de estudos com a finalidade de desenvolver metodologias eficientes para a micropropagação de *Peltophorum dubium*.

Estudos desenvolvidos com *Peltophorum dubium* objetivaram selecionar métodos para a superação de dormência e para a desinfestação superficial de sementes, bem como os meios nutritivos e tipos de explantes mais adequados para o estabelecimento *in vitro* da espécie. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos de auxinas e carvão ativado no enraizamento *in vitro* de brotações (BASSAN, 2006). Posteriormente, em outro estudo, foi analisado o efeito de combinações de diferentes fontes e concentrações de citocininas na multiplicação *in vitro*, assim como o efeito de meios nutritivos e diferentes fontes e concentrações de auxinas e de substratos alternativos ao ágar na formação *in vitro* de raízes (CURTI, 2011). Os resultados obtidos em ambos os estudos citados indicaram que a espécie tem potencial para a micropropagação, no entanto, não permitiram o desenvolvimento de

um protocolo eficiente de propagação clonal a partir da cultura de tecidos (CURTI, 2011).

Em virtude disso, o presente estudo teve como objetivo contribuir com as pesquisas relacionadas à micropropagação da espécie, por meio da utilização de diferentes metodologias, visando elucidar aspectos referentes à multiplicação e à senescência foliar *in vitro* de *Peltophorum dubium*. O estudo está dividido em três capítulos:

- no capítulo I, foram testadas diferentes fontes e concentrações de fitorreguladores, combinados entre si ou isolados, na multiplicação *in vitro* e na senescência foliar de *Peltophorum dubium*.
- no capítulo II, avaliou-se o efeito de diferentes fontes e concentrações de fitorreguladores e tipos de explantes, na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*.
- no capítulo III, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D sobre diferentes explantes cultivados na presença ou ausência de luz, na indução de calos em *Peltophorum dubium*.

2 REVISÃO GERAL

2.1 Descrição da espécie *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert

Peltophorum dubium (Sprengel) Taubert, pertencente à família Fabaceae e conhecida popularmente como canafistula, faveiro, angico-bravo, tamboril, entre outros, é uma espécie frequente em todo o domínio da floresta estacional semidecidual, abundante em formações secundárias, mas com poucos indivíduos. A espécie é caracterizada por seu grande porte, ocupando o estrato dominante do dossel em floresta primária (LORENZI, 1992; MARCHIORI, 1997). Como é uma planta rústica e de rápido crescimento, é comumente encontrada colonizando pastagens, ocupando clareiras e bordas de matas, sendo também utilizada para a composição de reflorestamentos mistos de áreas degradadas de preservação permanente (DONADIO; DEMATTÊ, 2000).

Suas flores são amarelas e são encontradas em panículas terminais, o que faz a espécie ser frequentemente indicada para a arborização de praças, parques e rodovias (LORENZI, 1992). *Peltophorum dubium* apresenta extensa distribuição natural, desde a Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul até o Paraná (LORENZI, 1992; DURIGAN et al., 1997; MARCHIORI, 1997). Desenvolve-se naturalmente em vários tipos de solo, sendo pouco exigente quanto à fertilização química e apresentando um rápido crescimento e fácil adaptação (CARVALHO, 2003).

A espécie possui valor econômico devido à qualidade da sua madeira e potencial para a utilização em plantios comerciais, podendo, também, ser empregada com sucesso no paisagismo, pois a árvore, além de ornamental, proporciona ótima sombra (MATTEI; ROSENTHAL, 2002; LORENZI, 1992). Sua madeira tem sido aproveitada para múltiplas aplicações, e sua casca contém tanino que é utilizado em curtumes (GUERRA et al., 1982).

A formação de mudas de *Peltophorum dubium* é fácil pela abundante produção de sementes (SALERNO et al., 1996), as quais, no entanto, apresentam forte dormência tegumentar. O tegumento impermeável das leguminosas é composto por uma camada de células em paliçada, e recoberto externamente por

camadas cuticulares cerasas. A desintegração da capa destas células, ou a separação das mesmas, é possível por meio de um estresse que permitiria a entrada de água e a consequente germinação (HARTMANN; KESTER, 1975). Dessa maneira, a dormência pode ser superada, o que ocorre em ambientes naturais pelo aumento repentino da temperatura do solo por ocasião da abertura de clareiras na floresta. Para a obtenção de mudas, são sugeridos tratamentos de escarificação mecânica cortando-se o tegumento na região oposta àquela em que ocorre a protusão da radícula (CARVALHO, 2003).

Conforme exposto anteriormente, a literatura especializada mostra muitas informações quanto às características botânicas, morfológicas e usos desta espécie; no entanto, existem escassas informações no tocante ao estabelecimento, multiplicação e às técnicas de obtenção de mudas de *Peltophorum dubium* (GUERRA et al., 1982), na atualidade, principalmente no que se refere à propagação assexuada.

2.2 Cultura de tecidos vegetais: micropopragação

Do ponto de vista biológico, os organismos vivos se reproduzem sexual ou assexuadamente. No primeiro caso, a variabilidade genética e a evolução são favorecidas; no segundo, isso não acontece. Nas plantas superiores, a reprodução assexuada pode ocorrer por meio de vários processos, tais como: enraizamento de estacas, enxertia, apomixia e micropopragação (CID; TEIXEIRA, 2010).

Um dos métodos para a obtenção de plantas assexuadamente é por meio da cultura de tecidos, que é uma ferramenta importante visando à conservação e a multiplicação das espécies vegetais. O princípio básico da cultura de tecidos vegetais é denominado “totipotência”, ou seja, qualquer célula viva no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa (DUTRA, WENDLING, 2010). A cultura de tecidos é utilizada em uma ou mais etapas do melhoramento de plantas e apresenta, como principais vantagens em relação à macropropagação, a produção de mudas livres de doenças, a exigência de pouco espaço físico, a taxa de multiplicação superior à obtida com a estaca convencional, a produção de mudas em curto espaço de tempo e em

quantidade suficiente para a demanda (RIMBAWANTO et al., 1991; SCHIAVINATO et al., 2008). Além disso, permite o aumento na produção, por isso contribui para que os laboratórios e os países que a adotam tenham mais vantagens competitivas (CID; TEIXEIRA, 2010).

As técnicas de cultura de tecidos vegetais constituem-se em ferramentas que podem ser aplicadas para a propagação massal de genótipos superiores, que tem proporcionado a sobrevivência das espécies florestais (OLTRAMARI et al., 2000). Os procedimentos mais usuais da cultura de tecidos são: a micropropagação *in vitro* (ou propagação vegetativa *in vitro*), a microenxertia, a conservação de germoplasma e a cultura de embriões, ovários ou anteras. A aplicação de cada uma dessas metodologias depende, dentre outros fatores, da disponibilidade do material para ser trabalhado e dos recursos designados à pesquisa (GUERRA; NODARI, 2006).

A micropropagação é a modalidade, dentro da cultura de tecidos, que mais se tem difundido (ERIG; SCHUCH, 2005). Nesta técnica, órgãos e tecidos de plantas são introduzidos *in vitro*, estabelecidos e mantidos em culturas assépticas para regenerar novas plantas (REIS et al., 2008). Desse modo, por meio da micropropagação, podem ser regeneradas, no período de um ano, milhares de plantas clonais a partir de uma pequena porção de tecido vegetal, além de possibilitar o intercâmbio de material vegetal isento de problemas fitossanitários e a multiplicação, em qualquer época do ano, dos estoques mantidos *in vitro* (HU; WANG, 1984).

Dentre os fatores que podem influenciar a micropropagação *in vitro* estão os fatores externos como a temperatura, umidade relativa, fotoperíodo, intensidade luminosa e, também, fatores intrínsecos ao crescimento e desenvolvimento vegetativo, dependentes das condições nutricionais do meio nutritivo e da aplicação de fitorreguladores. A definição do meio nutritivo adequado a cada espécie, os fitorreguladores e a sua concentração são imprescindíveis para o sucesso da propagação de culturas *in vitro* (LEITZKE; DAMIANI; SCHUCH, 2010).

Dessa maneira, mesmo sendo uma prática onerosa em termos de mão de obra, de laboratório e de equipamentos, a micropropagação oferece uma melhor relação custo-benefício, pois permite produzir, em escala comercial, material uniforme e selecionado, bem como realizar pesquisas de apoio às diferentes áreas da biologia, como a genética, a fitopatologia e a fisiologia vegetal, tornando-se uma alternativa para a regeneração de plantas que apresentam dificuldades de

reprodução natural e, também, nas quais os métodos convencionais de propagação vegetativa não se tornam viáveis (THORPE et al., 1991; CID; TEIXEIRA, 2010).

2.2.1 Reguladores de crescimento vegetal

Os hormônios vegetais são biomoléculas produzidas pela planta, cuja finalidade é induzir respostas fisiológicas, tais como a formação de raízes, indução de brotos, alongamento de entrenós, entre outros. Nas plantas, existem vários tipos de hormônios, os quais são classificados como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico e ácido jasmônico (CID; TEIXEIRA, 2010). A composição e a concentração dos hormônios no meio nutritivo são fatores determinantes do crescimento e do padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas da cultura de tecidos (CALDAS et al., 1990).

Na cultura de tecidos, as auxinas e citocininas, em formas naturais ou sintéticas (fitorreguladores), fazem parte do grupo de reguladores de crescimento mais frequentemente usados. As giberelinas são usadas ocasionalmente, enquanto o etileno e o ácido abscísico são de uso muito raro (CID; TEIXEIRA, 2010). O equilíbrio entre auxina e citocinina é uma das relações primárias na propagação de plantas, em que uma alta relação auxina/citocinina favorece o enraizamento, uma baixa relação favorece a formação de brotações; e um alto nível de ambas favorece o desenvolvimento de calo (XAVIER et al., 2009b).

Entre as auxinas, frequentemente usadas na indução de calos a partir de um explante e no enraizamento a partir de brotos, o ácido 3-indolacético (AIA) é a mais conhecida. Adicionalmente, são exemplos de auxinas: ácido α -naftalenoacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) e ácido 4-amino-3,5,6-tricolo-picolinico ou Picloram[®] (CID; TEIXEIRA, 2010). A aplicação de auxinas em órgãos isolados promove aumento da resposta desejada (formação de raízes, formação de parte aérea, etc.), paralelamente ao aumento da concentração até certo nível, após o qual ocorre efeito inibitório. Entretanto, a resposta da planta à auxina endógena ou exógena varia tanto com a natureza do tecido quanto com a concentração da substância presente (XAVIER et al., 2009b).

As citocininas pertencem a um grupo de substâncias que promovem a divisão celular, são indispensáveis para a quebra da dominância apical e na indução da proliferação de gemas axilares (HU; WANG, 1984; XAVIER et al., 2009b). Entre as citocininas naturais encontram-se zeatina (ZEA) e 2-isopenteniladenina (2iP) enquanto, entre as sintéticas, destacam-se cinetina (CIN), 6-benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) (CID; TEIXEIRA, 2010). A escolha do tipo de citocinina e sua concentração são os principais fatores que influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2008; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; HU; WANG, 1984). Contudo, a presença constante ou excessiva de citocininas e de auxinas no meio de indução ou de multiplicação de brotos pode desequilibrar exageradamente o balanço hormonal endógeno dos explantes, além de inibir as respostas desejadas (LEMOS, 2010). Dessa maneira, o conhecimento da espécie, a definição dos objetivos a serem alcançados com determinada técnica de propagação vegetativa, a escolha e o uso correto dos propágulos vegetativos são de extrema importância (XAVIER et al., 2009b).

2.2.2 Multiplicação *in vitro*

A fase de multiplicação de uma cultura caracteriza-se pela proliferação de brotos axilares ou adventícios em número variável, conforme o genótipo utilizado, determinando a sua capacidade em formar folhas e novos meristemas. Nesta etapa, deve-se levar em consideração, além de vários outros fatores, o estado fisiológico dos explantes, as concentrações endógenas de hormônios nos explantes, as condições ambientais de crescimento e os cuidados na manipulação do material durante as subculturas (PEREIRA; FORTES, 2003; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Na multiplicação, deseja-se a produção de grande quantidade de mudas, nesta fase, os objetivos principais são os de obtenção de alta taxa de multiplicação, explantes livres de contaminantes que prejudiquem a micropropagação, proliferação de partes aéreas (brotamento lateral) e gemas reativas e que produzam partes aéreas com qualidade suficiente para a fase seguinte (XAVIER et al., 2009c). Entretanto, a taxa de multiplicação e o desenvolvimento vegetativo de plantas *in vitro*

são considerados fatores limitantes para o aumento de produtividade dos laboratórios comerciais (MEDEIRO, 2001).

Uma maior taxa de multiplicação *in vitro* implica na maior velocidade do processo de micropropagação e na redução da necessidade de constante estabelecimento de novas culturas (SANTOS et al., 2006). Todavia, na etapa de multiplicação, seria interessante estudar a relação custo-benefício, ou seja, verificar a viabilidade de obter uma alta taxa de multiplicação, reduzindo o tempo de cultivo *in vitro* e realizando subcultivos frequentes ou, se o ideal seria reduzir a taxa de multiplicação, aumentando o ciclo *in vitro* e reduzindo a frequência de subcultivos.

2.2.3 Senescência foliar

A senescência foliar é uma sequência de eventos bioquímicos e fisiológicos que constituem a fase final do desenvolvimento da folha, constituindo um processo caracterizado pela perda de clorofila e proteínas (CAO et al., 2003; LIM; NAM, 2007). A senescência é, ainda, um fenômeno complexo do ponto de vista histológico, fisiológico, bioquímico e genético-molecular (genes e promotores envolvidos), sendo um fator limitante na multiplicação *in vitro* de muitas espécies vegetais (BARRUETO CID, 2005; LIM et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007).

As mudanças que ocorrem durante a senescência foliar são altamente reguladas e geneticamente programadas por meio de ações coordenadas em níveis celulares, de tecidos, órgãos e organismo (LIM; NAM, 2007). Fatores ambientais como grau de nutrição, horas luz, estresse térmico ou hídrico, podem estimular este fenômeno na planta (nas folhas), dificultando ou impedindo em nível molecular ou celular a ação ou presença dos fatores que preservam a planta deste desarranjo metabólico (BARRUETO CID, 2005; VEERASAMY et al., 2007). A idade da folha também é um fator que desencadeia a senescência foliar nas plantas, sendo que as folhas mais velhas, que ficam sob o dossel, entram em senescência mais cedo do que as folhas que ficam na porção superior (WINGLER et al., 2006).

Entretanto, o principal fator que regula o processo de senescência é o balanço entre os níveis de fitorreguladores, principalmente, citocininas e auxinas. Quando as concentrações de citocininas e auxinas diminuem abruptamente em

órgãos maduros é induzido o início da senescência, dessa maneira, a aplicação exógena destes fitorreguladores inibe a degradação da clorofila e proteínas fotossintéticas que ocorre durante o processo de senescência foliar (OLIVEIRA et al., 2007; WINGLER et al., 1998). O uso de citocininas com a finalidade de retardar a senescência foliar tem potencialidade para aumentar a produtividade da colheita, para prolongar o armazenamento pós-colheita e aumentar a tolerância ao estresse (LIM et al., 2007). Contudo, a capacidade para retardar a senescência foliar, varia amplamente entre os diversos tipos de fitorreguladores, que agem de maneira antagônica ao etileno, ou seja, atuam retardando a senescência de vegetais (LUCCHETTA, 2007).

Os estudos referentes ao processo de senescência foliar nos vegetais, principalmente em se tratando de espécies lenhosas, ainda são escassos e incipientes. Dessa maneira, não foram observados, na literatura, registros acerca da influência de citocininas e auxinas e, ainda, do período adequado de cultivo *in vitro* em espécies florestais, tampouco em *Peltophorum dubium*, justificando-se a necessidade de estudos alusivos à senescência foliar nesta espécie cuja multiplicação *in vitro* vem sendo estudada em nosso Grupo de Pesquisa.

2.2.4 Calogênese

Uma das peculiaridades da micropropagação é a possibilidade do maior controle das diferentes fases do crescimento dos explantes *in vitro* (HARTMANN et al., 2002). Durante a micropropagação, a produção de plantas pode ser obtida via organogênese direta ou por meio da organogênese indireta (passando pela fase de calo), sendo que o controle do tipo de organogênese depende do balanço dos hormônios exógenos (LEMOS, 2010).

A calogênese é um processo importante, pois os calos podem conter células ou grupo de células que possuem centros ativos de divisão celular e, quando em condições adequadas, esses centros são induzidos e se capacitam para a produção de órgãos (ROCHA; QUOIRIN, 2004). O calo corresponde a uma massa de células desorganizadas e parcialmente indiferenciadas que variam quanto ao tipo, tamanho, conteúdo celular e espessura da parede (FLORES et al., 1998). Fatores como o

tamanho do explante, o órgão fornecedor do explante, a idade e época do ano em que o explante é colhido, o genótipo da planta doadora e a composição do meio nutritivo interferem na formação de calos, que podem dar origem a diferentes órgãos, dependendo do interesse da pesquisa, sendo que essa formação é induzida pelo balanço hormonal obtido entre os níveis de citocininas e auxinas, exógenas e endógenas à planta (DEUS et al. 2007; NOGUEIRA et al., 2007; CERQUEIRA et al., 2002).

No que concerne aos fitorreguladores, a indução de calos é geralmente favorecida por uma relação equilibrada entre auxina/citocinina, assim como pela adição de outros componentes ao meio nutritivo ou mesmo pelo genótipo empregado (PESCADOR et al., 2000). Quanto aos explantes, qualquer tecido vegetal pode ser utilizado como explante. Entretanto, procuram-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os calos podem ser multiplicados por sucessivas subculturas, mantidos *in vitro* por longos períodos e são de grande importância para estudos morfogenéticos *in vitro* e, através da suspensão de células, para a obtenção de produtos secundários, incluindo fármacos, representando uma biotecnologia de grande interesse científico e comercial (RODRIGUES; ALMEIDA, 2010). Dessa maneira, a formação de calos a partir de um explante representa uma etapa fundamental no processo de formação de órgãos, necessitando, primeiramente, de estudos acerca da concentração ideal e tipos de fitorreguladores e, fonte de explantes a serem utilizados na sua indução (MORALES et al., 1999).

3 CAPÍTULO I

EFEITO DE DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE FITORREGULADORES NA MULTIPLICAÇÃO E NA SENESCÊNCIA FOLIAR *IN VITRO* DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

3.1 Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a multiplicação e a senescência foliar *in vitro* de *Peltophorum dubium* por meio do uso de diferentes fontes e concentrações de fitorreguladores (BAP, CIN, 2iP, TDZ, ANA) e, ainda, o período ideal de cultivo em que a senescência foliar é reduzida. Cinco ensaios foram conduzidos em laboratório, sendo que, em todos os ensaios foi utilizado o meio nutritivo MS, o delineamento experimental inteiramente casualizado e epicótilos contendo o nó cotiledonar como explantes. Houve problemas com a refrigeração da sala de cultivo durante a execução dos três primeiros ensaios, portanto, neste período, a temperatura extrapolou a faixa usualmente empregada no laboratório. Para os três primeiros ensaios foram avaliadas as variáveis explantes que emitiram brotações adventícias, explantes que formaram calos, brotações que apresentaram vitrificação e clorose foliar - expressas em porcentagem e o número de brotos por explante e, quando foi observado o início de folhas com sinais de senescência, semanalmente, foram realizadas avaliações desta variável. Para o quarto e quinto ensaios, avaliou-se, semanalmente, o número de folhas com sinais de senescência. Pode-se verificar que o emprego de 2iP, nas concentrações testadas, na presença de ANA ou em conjunto com ANA e BAP, não exerce influência na multiplicação *in vitro* de epicótilos contendo o nó cotiledonar de *Peltophorum dubium*. Ainda, aos 21 dias de cultivo *in vitro*, em condições de temperatura elevada, ocorre expressiva senescência foliar. As citocininas utilizadas, nas concentrações testadas, não influenciam na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*. Quando a citocinina utilizada é TDZ, é dispensável a utilização da auxina ANA, para que se mantenha controlada a senescência foliar, no entanto, quando é 2iP, a presença de ANA contribui para a redução no número de folhas senescentes. De maneira geral, a partir dos 21 dias de cultivo, a auxina e as citocininas utilizadas (ANA, 2iP e TDZ) passam a exercer efeito significativo na ocorrência de senescência foliar, a qual vai depender da combinação dos fitorreguladores.

Palavras-chave: Canafístula. Micropropagação. Fitorreguladores.

EFFECT OF DIFFERENT SOURCES AND CONCENTRATIONS OF PHYTOREGULATORS *IN VITRO* MULTIPLICATION AND LEAF SENESCENCE OF *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

3.2 Abstract

This study aimed to evaluate the *in vitro* multiplication and leaf senescence of *Peltophorum dubium* by the use of different sources and concentrations of growth regulators (BAP, KIN, 2iP, TDZ, NAA) and also the ideal culture period in which leaf senescence is reduced. Five experiments were carried out in the laboratory and in all tests we used the nutritive medium MS, the completely randomized design and epicotyls containing cotyledonary nodes as explants. There were problems with the cooling of the culture room during the execution of the first three experiments, so in this period, the temperature extrapolated the range usually employed in the laboratory. For the first three experiments were evaluated the following variables: explants that issued adventitious shoots, explants that formed callus, shoots that showed vitrification and leaf chlorosis - all expressed in percentage - and number of shoots per explant and, when it was observed the beginning of signs of leaf senescence, at each week was evaluated this variable. For the fourth and fifth experiment was evaluated at each week the number of leaves with signs of senescence. We can checked that using 2iP, in the evaluated concentrations in the presence of ANA or in association with NAA and BAP, does not influence *in vitro* multiplication of the epicotyls containing cotyledonary nodes of *Peltophorum dubium*. Further, after 21 days of *in vitro* culture, under conditions of high temperature, occurs expressive leaf senescence. The cytokinins used in evaluated concentrations, do not influence the *in vitro* multiplication of *Peltophorum dubium*. When the cytokinin used is TDZ, it is unnecessary to use the auxin NAA in order to maintain controlled leaf senescence, however, when is 2iP, the presence of NAA contributes to a reduction in the number of senescent leaves. Overall, from the 21 days of culture, the auxin and cytokinin used (NAA, 2iP and TDZ) shall have a significant effect on the occurrence of leaf senescence, which will depend on the combination of growth regulators.

Keywords: Forest species. Micropropagation. Phyto regulators.

3.3 Introdução

A espécie florestal *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert (canafístula) possui diversas possibilidades de uso podendo ser empregada em reflorestamentos, recuperação de áreas degradadas, fabricação de móveis e no paisagismo em geral. Contudo, suas sementes possuem dormência tegumentar que pode ser superada por meio de escarificação mecânica (com lixa), escarificação química (com ácido sulfúrico) ou imersão das sementes em água quente (GUERRA et al., 1982; OLIVEIRA et al., 2003). Para *Peltophorum dubium*, assim como para a maioria das espécies florestais nativas do Brasil, são poucos os trabalhos realizados com o objetivo de selecionar genótipos dotados de maior produtividade e qualidade. Nesse contexto, técnicas de cultura de tecidos, marcadores moleculares e transformação genética, podem ser associadas ao melhoramento convencional com a finalidade de suprir essa carência (SARTORETTO et al., 2008).

A cultura de tecidos abrange diversas técnicas, dentre as quais se destaca a micropropagação. Esta técnica, que pode ser utilizada para fins de conservação e/ou multiplicação de espécies florestais, necessita de pouco espaço físico, produz um grande número de plantas uniformes em um tempo relativamente curto, as quais são isentas de problemas fitossanitários. Entretanto, para que isso ocorra, é necessário, entre outros requerimentos, que o meio nutritivo empregado forneça as substâncias essenciais para o adequado crescimento e desenvolvimento vegetal *in vitro* (CORDEIRO et al., 2004). Nesse sentido, dentre os pontos mais importantes para a adequada nutrição *in vitro* destacam-se aqueles referentes ao suprimento de fitorreguladores, mais especificamente, de citocininas e auxinas e, também, aos meios nutritivos a serem utilizados (CHAVES et al., 2005).

Conforme já relatado em alguns trabalhos (BASSAN, 2006; CURTI, 2011), *Peltophorum dubium* tem potencial para ser cultivada *in vitro*, entretanto, há a ocorrência de senescência foliar (BASSAN, 2006) no decorrer dos cultivos. Este processo está associado à evolução das plantas, caracterizado pela degradação da clorofila, lipídios, proteínas e RNA, causando a morte das células (McCABE et al., 2001). Em qualquer espécie vegetal, a senescência pode ser induzida por fatores ambientais, como baixa intensidade luminosa, deficiência nutricional, ataques de patógenos, estresse hídrico e a própria separação do órgão da planta, associada a

fatores endógenos, como a idade do órgão e desenvolvimento reprodutivo (MCCABE et al., 2001). Já no cultivo *in vitro* ocorre a interferência dos fitorreguladores, dentre os quais as auxinas e citocininas são as classes que estão diretamente ligadas ao processo de senescência, principalmente as citocininas (LUCCHETTA et al., 2007).

As auxinas são fitorreguladores que se destacam na redução da senescência de folhas, retardo na abscisão de órgãos, no desenvolvimento de partes florais e na formação de raízes (DAVIES, 2004). As citocininas, por sua vez, participam de todas as fases do crescimento e desenvolvimento dos vegetais, atuam na divisão e diferenciação celular e, assim como as auxinas, têm tido destaque na redução da velocidade de senescência das folhas (associado ao maior acúmulo de clorofila) e no desenvolvimento vegetativo (DAVIES, 2004; HEDDEN; PHILIPS, 2000; MCCABE et al., 2001). Entretanto, a competência para retardar a senescência foliar varia amplamente entre os diversos grupos de citocininas (GENKOV et al., 1997).

Frente ao exposto e, devido à carência de estudos referentes à propagação vegetativa e à senescência foliar *in vitro* de *Peltophorum dubium*, o presente estudo objetivou avaliar o efeito de fontes e concentrações de citocininas na multiplicação e na senescência foliar *in vitro* de *Peltophorum dubium* e, ainda, o período adequado de permanência das brotações no meio nutritivo, em que ocorra uma redução na presença de folhas com sinais de senescência.

3.4 Material e métodos

Foram conduzidos cinco ensaios no laboratório, os quais utilizaram sementes de *Peltophorum dubium* coletadas e armazenadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro/Florestas em Santa Maria, RS, provenientes da produção de 2010. Após a aquisição, as sementes permaneceram armazenadas no laboratório em frascos de vidro e acondicionadas em temperatura de 8-10 °C, em refrigerador, até o seu emprego nos ensaios, que foram realizados nos anos de 2011 e 2012.

Inicialmente, as sementes foram submetidas à superação de dormência por meio de escarificação mecânica com lixa nº 100 na região oposta ao eixo

embrionário. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas superficialmente por imersão em solução de etanol a 70 % (v/v) por 30 s e, após, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2 % (v/v) por 15 min, passando, então, por triplo enxágue em água estéril.

Visando à obtenção de explantes de origem seminal, na germinação *in vitro* as sementes foram inoculadas, em câmara de fluxo laminar, em frascos de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio ágar-água a 0,7 % (m/v), previamente autoclavado por um período de 40 min a 121 °C e 1 atm de pressão. Em cada frasco foram colocadas cinco sementes e, a seguir, foi efetuada sua vedação com papel alumínio. A germinação foi conduzida em sala de cultivo, em temperatura de 25±3 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia. Quando a maioria das sementes germinou, foram isolados os explantes, que consistiram de epicótilos contendo o nó cotiledonar, com aproximadamente 10 mm de comprimento (Figura 1). Imediatamente após serem seccionados, os explantes foram inoculados em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sendo utilizados nos ensaios de multiplicação *in vitro* descritos a seguir.

O meio nutritivo MS foi suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar e 1 g L⁻¹ de carvão ativado, sendo também acrescentadas as diferentes fontes e concentrações de citocinina, conforme o ensaio. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado a 120 °C e 1 atm de pressão por 15 min.

Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo, em fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia. Entretanto, deve ser esclarecido que durante a execução dos três primeiros ensaios (3.4.1, 3.4.2 e 3.4.3) relatados a seguir, no presente capítulo, a temperatura no interior da sala de cultivo extrapolou em muito a faixa usualmente empregada no laboratório (25±3 °C), em função de problemas na refrigeração da sala e das elevadas temperaturas do ar que ocorreram no período. Porém, infelizmente, não foram efetuados registros sistemáticos da temperatura que ocorreu no período, observando-se, de uma maneira geral, que as temperaturas máximas excediam, muitas vezes, os 30° C e as mínimas, ficavam em torno de 10-15 °C. Contudo, durante a execução do quarto e

quinto ensaios (3.4.4 e 3.4.5), não houve problemas na refrigeração da sala de cultivo, com a temperatura da sala de cultivo permanecendo em 25 ± 3 °C.

Em todos os ensaios, foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro de 150 mL contendo 30 mL de meio nutritivo e três explantes.



Figura 1 - Fonte de explantes e tipo de explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert utilizados nos ensaios de multiplicação *in vitro*. A) Planta germinada *in vitro* com círculo indicando o epicotilo e B) Epicotilo contendo o nó cotiledonar. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

3.4.1 Efeito de 2-isopenteniladenina (2iP) em presença de ácido α -naftalenoacético (ANA) na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*

Neste primeiro ensaio, os tratamentos consistiram de 0, 5, 10 ou 20 μ M da citocinina 2iP associados a 0,05 μ M da auxina ANA, totalizando quatro tratamentos com nove repetições cada. Em relação à senescência, avaliaram-se quatro diferentes períodos de cultivo (21, 28, 35 ou 42 dias), resultando um arranjo bifatorial 4x4, totalizando 16 tratamentos com nove repetições cada.

3.4.2 Efeito de 2iP em presença de ANA e 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*

Neste ensaio, os tratamentos consistiram de 0, 5, 10 ou 20 μM da citocinina 2iP combinados a 5 μM da citocinina BAP e 0,05 μM da auxina ANA, totalizando quatro tratamentos com 10 repetições cada. Na análise da senescência, os períodos de cultivo avaliados foram 20, 27, 34 ou 41 dias, resultando, também, em um arranjo bifatorial 4x4, totalizando 16 tratamentos com 10 repetições cada.

3.4.3 Efeito das fontes e concentrações de citocininas na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*

Neste terceiro ensaio, foi utilizado um arranjo bifatorial 4x4, os níveis do fator “A” referiram-se à fonte de citocinina, enquanto os níveis do fator “B”, às respectivas concentrações. Os tratamentos consistiram de 0, 5, 10 ou 15 μM das citocininas BAP, cinetina (CIN), 2iP ou thidiazuron (TDZ), totalizando 16 tratamentos com 10 repetições cada. Em relação à avaliação da senescência, foi desta vez, empregado um arranjo trifatorial 4x4x5, em que os níveis do fator “A” referiram-se à fonte de citocinina utilizada, os níveis do fator “B”, às concentrações e os níveis do fator “C”, aos períodos de cultivo (7, 14, 21, 28 ou 35 dias), totalizando 80 tratamentos com 10 repetições cada.

3.4.4 Efeito de thidiazuron (TDZ) e ANA na senescência foliar *in vitro* de *Peltophorum dubium*

Este ensaio consistiu em um arranjo trifatorial 4x3x4, em que os níveis do fator “A” referiram-se as concentrações de TDZ, os níveis do fator “B” às concentrações de ANA e os níveis do fator “C”, aos diferentes períodos de cultivo. Os tratamentos consistiram de 0; 5; 10 ou 15 μM da citocinina TDZ, 0; 0,05 ou 0,1

µM da auxina ANA e os períodos de cultivo (7, 14, 21 ou 28 dias) totalizando 48 tratamentos com oito repetições cada.

3.4.5 Efeito de 2iP e ANA na senescência foliar *in vitro* de *Peltophorum dubium*

Igualmente ao anterior, neste ensaio, foi utilizado um arranjo trifatorial 4x3x4, em que os níveis do fator “A” referiram-se as concentrações de 2iP, os níveis do fator “B” às concentrações de ANA e os níveis do fator “C”, aos diferentes períodos de cultivo. Os tratamentos consistiram de 0; 5; 10 ou 15 µM da citocinina 2iP, 0; 0,05 ou 0,1 µM da auxina ANA e os períodos de cultivo (7, 14, 21 ou 28 dias) totalizando 48 tratamentos com oito repetições cada.

3.5 Variáveis analisadas

Para os três primeiros ensaios (3.4.1., 3.4.2 e 3.4.3), aos 30 dias de cultivo *in vitro* foram avaliadas as seguintes variáveis: explantes que emitiram brotações adventícias (% EBAP), explantes que formaram calo (% CALO), brotações que apresentaram vitrificação (% VITR) e clorose foliar (% CF) - expressas em porcentagem. A clorose foliar foi identificada pela presença de explantes com folhas amareladas e a vitrificação, pelo aspecto vítreo dos explantes.

Avaliou-se, ainda, o número de brotos por explante (Nº B/E) e, quando se observaram sinais de senescência (% SENES), semanalmente, foram realizadas avaliações desta variável (identificada pelo escurecimento seguido de queda de folhas).

Para os dois últimos ensaios (3.4.4 e 3.4.5), avaliou-se, semanalmente, a presença de folhas com sinais de senescência (identificada pelo escurecimento seguido de queda de folhas). Quando positiva essa ocorrência, e, foi registrado o número de folhas apresentando esses sinais (Nº FS).

3.6 Análise estatística

Para todos os ensaios, após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x + 0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, utilizou-se para a comparação das médias o teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade de erro. Quando houve interação entre os níveis dos fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa Sistema para Análise de Variância (SISVAR) para Windows®, versão 5.1 (FERREIRA, 2006).

Adicionalmente, quando o valor de F foi significativo, a precisão dos ensaios foi calculada por meio da acurácia seletiva (AS). Esta estatística corresponde à correlação linear entre os valores genotípicos e fenotípicos, sendo estimada por $AS=(1-1/F)^{1/2}$, em que F é o valor do teste F para genótipo e, quanto maior o seu valor, mais confiáveis são os resultados obtidos (STORCK et al., 2010).

3.7 Resultados e discussões

3.7.1 Efeito de 2iP em presença de ANA na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*

Neste ensaio, para todas as variáveis analisadas, com exceção das folhas com sinais de senescência, não houve efeito significativo do 2iP associado a 0,05 μ M de ANA. Este resultado demonstra que a citocinina utilizada, independente da concentração, não interfere nas variáveis avaliadas nesta fase do cultivo *in vitro* de *Peltophorum dubium*, sendo, portanto, dispensável.

Houve uma satisfatória formação de brotos adventícios ($p=0,6296$), uma vez que 83,92 % dos explantes responderam positivamente, sendo obtidos, para cada explante, em média, 3,9 brotos ($p=0,5967$). Diferentemente do que foi observado no

presente ensaio, em segmentos nodais de *Cabralea canjerana* (canjerana) cultivados em meio nutritivo MS, a utilização da citocinina BAP (a 2,5 μ M) resultou na maior porcentagem de explantes com brotos (27 %), que não diferiu significativamente do tratamento que empregou 2iP combinado com BAP (25,01 %), ambos a 2,5 μ M, e na ausência de ANA (ROCHA et al., 2007). Contudo, comparados aos resultados obtidos no presente ensaio, a porcentagem de explantes que formaram brotos foi bem inferior.

Igualmente, em segmentos caulinares de *Schizolobium amazonicum* (paricá) cultivados em meio nutritivo MS, o tratamento que resultou em maior número médio de brotações foi aquele que continha BAP a 13,3 μ M, quando comparado aos demais tratamentos (BAP a 0; 4,44; 6,67; 8,89 ou 11,11 μ M), na ausência de ANA, sendo obtidos, em média, 2,14 brotos por explante (CORDEIRO et al., 2004).

A formação calogênica média ($p=0,1617$) (Figura 2B), observada nos epicótilos de *Peltophorum dubium*, foi igual a 21,08 %, a qual pode ser considerada alta, resultado este que pode ser atribuído ao balanço hormonal endógeno presente nos explantes e, também, às altas temperaturas registradas na sala de cultivo. Da mesma maneira, em ápices foliares de *Eucalyptus urophylla* (eucalipto), a presença da citocinina e da auxina não exercearam influência sobre a calogênese, uma vez que seu cultivo em meio nutritivo MS, na presença de 2,3 μ M de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) ou de TDZ, ambos na ausência de ANA, não acarretou em formação de calos. Por outro lado, na presença de ANA, mesmo em pequenas concentrações (0,44 ou 2,22 μ M), estas mesmas concentrações de fitorreguladores (2,3 μ M), influenciaram significativamente a calogênese (DEUS et al., 2007).

Em relação à variável vitrificação ($p=0,2808$) (Figura 2A), foi observada uma média geral (8,25 %) relativamente expressiva, considerada o número de brotos formados por explante. A vitrificação observada deve ser decorrente da elevada temperatura registrada na sala de cultivo durante a execução do ensaio, que ocasionou acúmulo de umidade no interior dos frascos. Diferentemente do resultado obtido no presente ensaio, no cultivo de entrenós de *Malus* sp. (macieira) cv. Gala RW1, em meio nutritivo MS, a presença de TDZ e BAP a 5 μ M, combinados com as auxinas ANA, AIA e AIB nas concentrações 0; 5 ou 10 μ M, influenciou significativamente a ocorrência de vitrificações nas brotações, cujos entrenós se apresentaram encurtados naqueles tratamentos que continham TDZ (MORALES et al., 2009).

A clorose foliar ($p=0,3576$) (Figura 2C) apresentou média geral alta (17,42 %), a qual pode ter sido decorrente, também, da elevação de temperatura na sala de cultivo, como sugerido em relação à vitrificação, e/ou do excessivo período de cultivo em um mesmo meio nutritivo cujos nutrientes foram deplecionados, o que pode acarretar em necessidade de transferência ou subcultivo das brotações para meio nutritivo fresco em um período de tempo menor, a fim de não comprometer o seu desenvolvimento. De maneira diferente do presente ensaio, resultados obtidos, em outro trabalho, na multiplicação *in vitro* de epicótilos contendo o nó cotiledonar de *Peltophorum dubium* cultivados em meio nutritivo MS, suplementado com 0; 5 ou 10 μM das citocininas BAP, CIN, 2iP e TDZ, demonstraram que houve interação significativa entre os fatores principais concentrações e fontes de citocininas, sendo que, nesses tratamentos o desenvolvimento das brotações foi muito prejudicado, e a ocorrência de clorose foliar, associada a outros fatores, inviabilizou a posterior utilização das brotações emitidas (CURTI, 2011).

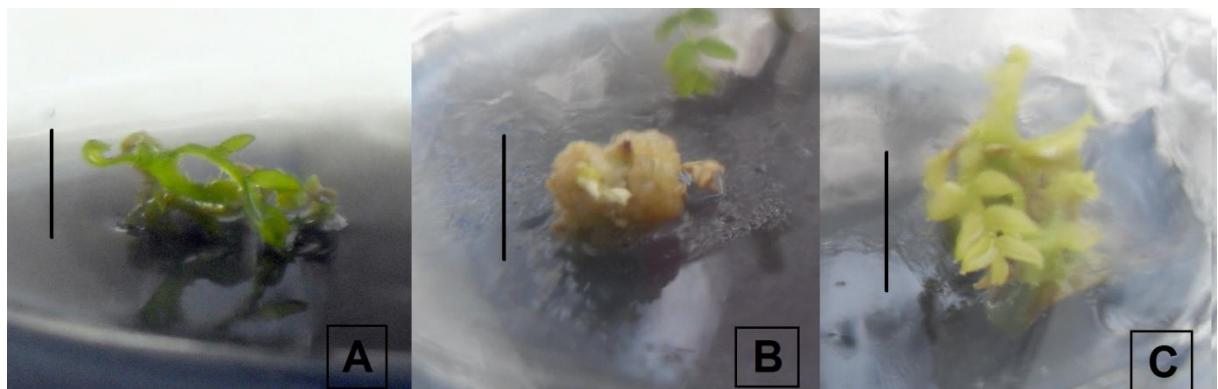


Figura 2 - Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo, em meio nutritivo MS suplementado com diferentes concentrações de isopenteniladenina (2iP) (a 0; 5; 10 ou 20 μM) na presença de 0,05 μM de ácido α -naftalenoacético (ANA) apresentando vitrificação (A), calo (B) e clorose foliar (C). Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

A avaliação semanal das folhas com sinais de senescência começou a ser realizada aos 21 dias, quando foi observado o início do escurecimento e queda de folhas (Figura 3). Observou-se efeito significativo apenas para o fator principal

período de cultivo ($p=0,000$; $AS=0,9636$), sendo que, nesta primeira avaliação ocorreu a menor porcentagem de folhas com sinais de senescência (33,11 %) e, aos 35 dias, observou-se a maior porcentagem (80,22 %). Em consequência dessa grande perda de folhas, aos 42 dias, o percentual foi reduzido para 67,25 %. Dessa maneira, observou-se que a porcentagem de senescência é proporcional ao tempo de permanência do explante no meio nutritivo e o ajuste a um comportamento linear crescente, talvez não tenha ocorrido porque não restavam mais folhas para cair nas brotações.

Entretanto, deve ser enfatizado que, durante a execução dos três primeiros ensaios relatados no presente capítulo, a temperatura no interior da sala de cultivo extrapolou em muito a faixa usualmente empregada no laboratório (25 ± 3 °C), e, essas temperaturas, mais altas que a temperatura ótima para o crescimento das plantas, afetaram negativamente o seu desenvolvimento, induzindo a vários efeitos fisiológicos e alterações metabólicas, incluindo-se a senescência prematura da folha (VEERASAMY et al., 2007). Inobstante, a AS estimada, para a senescência, apresentou um valor muito alto, indicando que os resultados obtidos são confiáveis, mas provavelmente não repetíveis em outros ensaios em função de que o manejo da temperatura na sala de cultivo foi, posteriormente, otimizado, de maneira a manter a temperatura do ar dentro da faixa recomendada.

Diferentemente do resultado obtido no presente ensaio, em segmentos nodais de *Annona glabra* (araticum-do-brejo) cultivados em meio nutritivo WPM – 'Wood Plant Medium' (LLOYD; McCOWN, 1981), foi observada uma ação efetiva das fontes de citocinina testadas (BAP a 4,44 µM, TDZ a 4,54 µM, CIN a 4,65 µM ou zeatina - ZEA a 4,56 µM) sobre o retardamento na degradação de clorofilas durante a senescência induzida. Entre as fontes sintéticas, CIN (a 4,65 µM) mostrou-se a mais eficiente em retardar a degradação de clorofila e a adição de citocininas ao meio nutritivo permitiu uma redução na senescência foliar da espécie durante o cultivo *in vitro*, possibilitando maior desenvolvimento das brotações (OLIVEIRA, 2007). Os resultados obtidos no presente ensaio indicam que outras fontes, concentrações e/ou combinações de citocininas, na presença ou não de auxinas, devem ser avaliadas na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*.

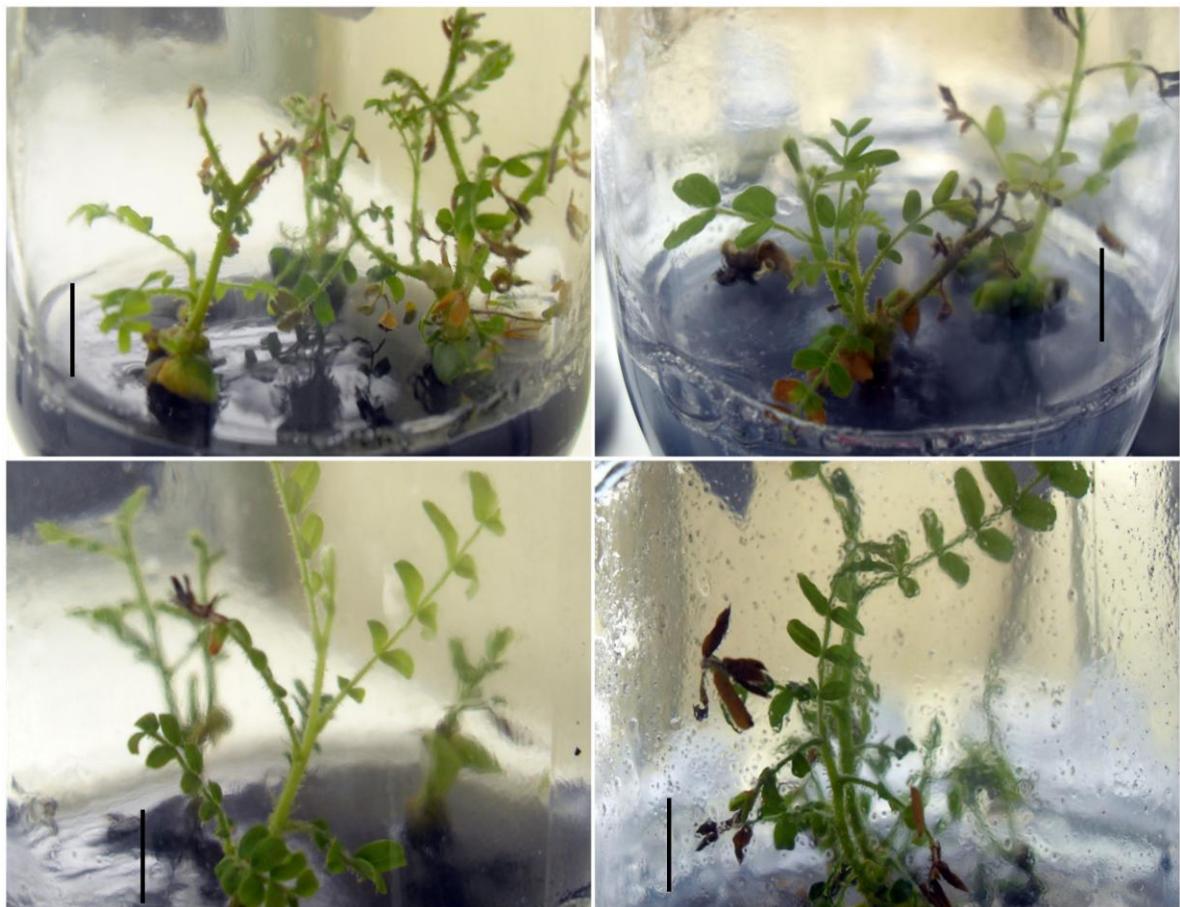


Figura 3 - Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 21 dias de cultivo, em meio nutritivo MS suplementado com diferentes concentrações de isopenteniladenina (2iP) (a 0; 5; 10 ou 20 μ M) na presença de 0,05 μ M de ácido α -naftalenoacético (ANA) apresentando sinais de senescência foliar. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

3.7.2 Efeito de 2iP em presença de ANA e BAP na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*

Neste ensaio, para todas as variáveis analisadas, não houve efeito significativo das concentrações testadas de 2iP associadas a 0,05 μ M de ANA e 5 μ M de BAP. Em relação aos explantes que emitiram brotações ($p=0,5809$), a média geral foi de 91,53 %, sendo observada uma formação média de 4,2 brotos por explante ($p=0,6133$). No presente caso, a combinação de citocininas na presença de

ANA, não exerceu efeito sobre estas variáveis, sendo seu emprego, na multiplicação *in vitro*, dispensável.

Em brotações micropagadas de porta-enxerto 'Tsukuba 1' de *Prunus persica* (pessegueiro) cultivadas em meio nutritivo MS (com redução de 50 % das fontes de nitrogênio), os tratamentos com 2iP não influenciaram significativamente a formação de brotações adventícias, mesmo na concentração mais alta estudada (4,44 μ M). Porém, o emprego isolado de BAP no meio nutritivo resultou em uma tendência linear crescente, com maior resposta na presença de 4,44 μ M desta citocinina, com 34,8 % de explantes que emitiram brotações e, em média, 1,25 brotações por explante (RADMANN, 2009), médias inferiores às obtidas para *Peltophorum dubium* no presente ensaio. Em segmentos nodais de *Cordia trichotoma* (louro-pardo), cultivados em meio nutritivo WPM, estudos confirmaram a eficiência de BAP como indutor de brotações em comparação a TDZ (a 0,45 μ M), apontando que a ação de BAP (a 0,44 μ M) combinado com GA₃ (a 0,29 μ M) resultou em um maior número de brotos (6,85), sendo que, com TDZ formaram-se, em média, apenas 2,50 brotos por explante, não diferindo significativamente (2,20) quando BAP (a 0,44 μ M) foi combinado com ANA (a 0,54 μ M) (MANTOVANI et al., 2007). Em segmentos nodais de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) cultivados em meio nutritivo MS, a concentração 4,5 μ M de BAP apresentou o maior percentual de brotações (34,65 %) quando comparada às concentrações 2,5 e 3,5 μ M, as quais apresentaram 31,33 % e 20 % de brotações, respectivamente, e não diferiram significativamente entre si (ARAGÃO et al., 2011).

Para os explantes em que houve formação de calos ($p=0,6641$), vitrificação ($p=0,5548$) e clorose foliar ($p=0,2413$) as médias gerais foram 28,13 %, 3,3 % e 4,13 % respectivamente. As médias, com exceção à calogênese, foram baixas e não são resultantes do emprego dos fitorreguladores, podendo-se atribuir o resultado obtido ao balanço endógeno dos hormônios, no caso da formação calogênica, e ao meio nutritivo e às condições de cultivo, em especial, à temperatura inadequada da sala de cultivo, que resultou em acúmulo de umidade nos frascos, para as demais variáveis. Resultado antagônico ao observado no presente ensaio foi obtido em segmentos nodais de *Cedrela fissilis* (cedro), em que a adição de ANA (a 1,25; 2,5 ou 5 μ M) ao meio nutritivo MS suplementado com 1,25; 2,5 ou 5 μ M de BAP estimulou a formação de calos, bem como causou inibição significativa na proliferação de gemas e no crescimento (NUNES et al., 2002). Igualmente, em

embriões de espécies precoces do gênero *Prunus* sp. (pêssegos e nectarinas), as brotações apresentaram calos e sintomas de vitrificação, reduzindo o número de propágulos aproveitáveis, quando foram acrescentados ao meio nutritivo MS 15 ou 20 μM de BAP, apesar do alto percentual de multiplicação observado (BARBOSA et al., 1990). Em relação à clorose foliar, diferentemente do resultado obtido no presente ensaio, em brotações de três clones de *Eucalyptus dunnii* (eucalipto) cultivadas em meio nutritivo MS, a presença de TDZ, nas concentrações 1; 5 ou 10 μM , induziu à formação de folhas cloróticas (GRAÇA et al., 2001).

Não houve efeito significativo dos fatores principais para a senescência, tampouco houve interação, sendo obtida uma elevada média geral (75,06 %) ao longo dos 41 dias de cultivo. Diferentemente do observado no ensaio anterior, em que houve efeito significativo dos dias de cultivo, no presente, os dias de permanência dos explantes no meio nutritivo não exerceram influência sobre a senescência, que foi um pouco inferior neste caso, sugerindo que a presença de BAP pode estar relacionada ao controle da senescência foliar. Em *Arabidopsis thaliana* e *Daucus carota*os, esta citocinina, em concentrações elevadas, pode promover a morte celular programada em culturas de células, acelerando a senescência (CARIMI et al., 2004). Por outro lado, há relatos de que a utilização de citocininas retarda a senescência foliar (LIM et al., 2007).

3.7.3 Efeito das fontes e concentrações de citocininas na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*

Neste ensaio, para a variável explantes que emitiram brotações não houve efeito significativo para as concentrações ($p=0,8955$), citocininas ($p=0,1013$) e nem para a interação ($p=0,5973$), sendo formadas brotações em 90,51 % dos explantes, o que demonstra que os fatores testados não interferiram nestas respostas. Por outro lado, em cotilédones de *Passiflora edulis* F. *flavicarpa* Deg. (maracujazeiro amarelo) cultivados em meio nutritivo MS, o efeito de BAP a 8,89 μM foi significativo, entretanto, a formação de brotos (em 51,7 % dos explantes) (RIBAS et al., 2002) foi inferior à obtida no presente ensaio.

Em relação ao número de brotos por explante, também não houve efeito significativo para as concentrações ($p=0,4452$), citocininas ($p=0,2280$) e nem para interação ($p=0,9059$). Foram obtidas, em média, 3,4 brotações por explante, resultado semelhante àqueles observados nos dois ensaios anteriores. Por outro lado, em segmentos foliares de *Bixa orellana* (urucum) cultivados em meio nutritivo MS, tratamentos que continham apenas BAP (a 2,22 μ M) formaram, em média, 15,71 brotos por explante, enquanto aqueles em que BAP (a 2,22 μ M) foi combinado com 2iP (a 2,46 μ M) apresentaram 10,89 brotos por explante e quando BAP (a 2,22 μ M) foi associado à 2iP (a 2,46 μ M) e CIN (a 2,32 μ M), formaram 16,50 brotos por explante (ALMEIDA et al., 1996), valores muito superiores aos obtidos no presente ensaio, mesmo tendo sido empregadas concentrações inferiores. Em fragmentos de folhas de *Malus domestica* Borkh (macieira) cultivados em meio nutritivo MS, o ponto de máxima eficiência técnica (MET) observado para o número médio de brotos (2,25) foi obtido com 13,37 μ M de TDZ. Entretanto, não houve diferença no número de brotos com o emprego de 4,54 e 13,62 μ M de TDZ (2,01 e 2,16 brotos respectivamente). Assim, os autores recomendaram utilizar a concentração mais baixa (4,54 μ M de TDZ), reduzindo o custo e obtendo-se, simultaneamente, uma menor intensidade de formação de calos (ERIG; SCHUCH, 2005).

Para a variável formação de calos (Tabela 1), houve efeito significativo apenas para o fator principal concentração de citocinina ($p=0,0007$; AS=0,9128) e o valor da AS estimada foi muito alto, permitindo, assim, depositar confiança nos resultados obtidos, mas provavelmente esses resultados não serão repetidos em outros ensaios, em função de que o manejo da temperatura na sala de cultivo foi, posteriormente, otimizado, de maneira a manter a temperatura do ar dentro da faixa recomendada. Foi possível observar que não houve formação de calos nas concentrações 5 μ M e 10 μ M de citocinina, sendo que, na ausência do fitorregulador verificou-se 0,83 % de formação calogênica, que não diferiu significativamente das concentrações anteriormente mencionadas. Entretanto, quando foram adicionados ao meio nutritivo, 15 μ M da citocinina, a formação de calos aumentou, significativamente, para 5,8 %. Este resultado sugere que na presença da maior concentração de citocininas, o balanço hormonal endógeno foi alterado, favorecendo a calogênese, culminando com uma formação de calos que pode ser considerada satisfatória quando a finalidade é a multiplicação *in vitro*, uma vez que o resultado foi

muito inferior ao obtido nos ensaios anteriores em que se observaram médias de 21,08% e 28,13%.

Tabela 1 – Porcentagem de formação de calos, em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (CIN), isopenteniladenina (2iP) ou thidiazuron (TDZ). Santa Maria, UFSM, RS, 2013.

Concentrações (μM)	Formação de calos (%)
0	0,83 a ¹
5	0,00 a
10	0,00 a
15	5,80 b
Média (%)	1,71
AS ²	0,9128

¹Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado. ²AS = acurácia seletiva, faixas: $\leq 0,5$ = Baixa; $0,5 < AS \leq 0,7$ = Moderada; $0,7 < AS \leq 0,9$ = Alta; $> 0,9$ = Muito Alta.

Este resultado difere do observado em discos foliares de *Coffea canephora* (café robusta) cultivados em meio nutritivo MS, em que foram obtidos 93,3 % de formação de calos na presença de 5μM de 2iP e 10μM de ácido indolbutírico (AIB). Essa porcentagem reduziu-se para 76,6 % quando a concentração de 2iP dobrou (10μM) e AIB manteve-se constante, sendo que os autores também constataram, que, na ausência dos fitorreguladores, não houve formação de calos (SANTOS et al., 2010). Esses resultados são decorrentes, provavelmente, do balanço hormonal que é alterado no momento em que uma fonte externa de regulador de crescimento é adicionada, culminando com a formação ou não de calos.

Em relação às variáveis vitrificação (média geral=3,86 %) e clorose foliar (média geral=1,29 %), também não houve efeito significativo para as concentrações ($p=0,064$ e $p=0,5161$ respectivamente), citocininas ($p=0,3352$ e $p=0,2310$ respectivamente) e nem para a interação ($p=0,8000$ e $p=0,4924$ respectivamente). Estes resultados indicam que as citocininas utilizadas, independente da

concentração, não interferiram na ocorrência de vitrificação e clorose foliar, as quais provavelmente foram decorrentes da composição do meio nutritivo e da temperatura elevada da sala de cultivo, assim como pode ter ocorrido nos ensaios anteriores.

Em segmentos nodais de *Persea* sp. cultivados em meio nutritivo MS, houve 63 % e 55 % de vitrificação na presença de 18,59 μ M de CIN ou 17,78 μ M de BAP, respectivamente (BIASI et al., 1994). Por outro lado, em segmentos nodais de port-enxerto de *Vitis vinifera* (videira) cultivados em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS, a concentração 1 μ M de BAP foi a que proporcionou a menor quantidade de explantes vitrificados (DZAZIO et al., 2002). Em relação à clorose foliar, em outro trabalho com epicótilos contendo o nó cotiledonar de *Peltophorum dubium* cultivados em meio nutritivo MS, a ausência de citocininas evitou a ocorrência de clorose foliar, contudo, com a utilização de 10 μ M de TDZ, foi observada clorose foliar em até 90 % dos explantes, o que prejudicou o desenvolvimento dos explantes (CURTI, 2011).

Para as folhas com sinais de senescência houve efeito significativo para a interação ($p=0,0036$; $AS=0,7984$) entre as concentrações e as fontes de citocininas (Tabela 2), em que a AS estimada foi alta, demonstrando que pode ser depositada confiança nos resultados obtidos, porém cuja repetibilidade pode estar comprometida em decorrência da falta de controle da temperatura. Houve uma alta intensidade de folhas senescentes, sendo que a menor porcentagem (55,4 %) foi obtida na presença de 5 μ M de TDZ, cujo emprego, sob o ponto de vista prático, não resultaria em vantagem para a multiplicação, haja vista a elevada senescência observada.

Em consequência, levando-se em consideração a falta de controle da temperatura ocorrente na sala de cultivo durante a execução do ensaio, torna-se temerário fazer inferências a respeito do efeito de TDZ sobre a senescência foliar em brotações de *Peltophorum dubium* cultivadas *in vitro*, sendo necessários estudos adicionais.

Tabela 2 - Porcentagem de folhas com sinais de senescência, em explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, ao longo de 42 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (CIN), isopenteniladenina (2iP) ou thidiazuron (TDZ). Santa Maria, UFSM, RS, 2013.

Concentrações (μ M)	Folhas com sinais de senescência (%)				
	BAP	CIN	2iP	TDZ	Média (%)
0	72,4 aA ¹	100,0 bB	74,4 aA	77,7 bA	81,9
5	73,7 aB	83,1 aB	63,0 aA	55,4 aA	70,1
10	62,3 aA	80,8 aA	80,5 aA	84,9 bA	76,9
15	80,5 aA	67,8 aA	62,3 aA	66,4 aA	69,3
Média (%)	72,2	83,2	70,0	72,4	74,6
AS ²		0,7984			

¹Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado. ²AS = acurácia seletiva, faixas: $\leq 0,5$ = Baixa; $0,5 < AS \geq 0,7$ = Moderada; $0,7 < AS \geq 0,9$ = Alta; $> 0,9$ = Muito Alta.

Em *Annona glabra* (araticum-do-brejo), os fitorreguladores TDZ e BAP demonstraram pouca efetividade no controle da degradação da clorofila, consequentemente, não auxiliaram no retardo da senescência foliar, apesar da elevada atividade de BAP na indução de brotações de anonáceas (LEMOS; BLAKE, 1996). Em contrapartida, a presença de ZEA retardou a degradação da clorofila em anonáceas e, desta maneira, retardou a senescência (ENCINA et al., 1994). Os resultados observados nestes estudos indicaram que uma mesma citocinina, de maneira isolada ou combinada com outros fitorreguladores, pode ser responsável por respostas diferenciadas dependendo da espécie, devendo a fonte e concentrações de fitorreguladores ser ajustados à espécie e ao objetivo da pesquisa.

3.7.4 Efeito de TDZ e ANA na senescência foliar *in vitro* de *Peltophorum dubium*

Para a variável analisada, observou-se uma reduzida média de folhas com sinais de senescência (inferiores a cinco de um total de 1340 folhas avaliadas) e, simultaneamente, efeito significativo para duas interações: entre as concentrações de TDZ e ANA ($p=0,0018$; AS=0,8496) (Tabela 3) e entre as concentrações de TDZ e o período de cultivo ($p=0,0034$; AS=0,8025) (Tabela 4).

Consideradas as médias de senescência observadas nos três primeiros ensaios relatados neste Capítulo, algumas tendo superado os 80 %, e que motivaram a realização do presente ensaio, é possível inferir que a falta de controle de temperatura na sala de cultivo foi a responsável pelo elevado percentual de abscisão de folhas observado na ocasião. Igualmente, pode-se creditar a senescência observada ao estresse térmico, ocasionado pela elevação da temperatura do ar, às culturas *in vitro* de *Peltophorum dubium*.

Adicionalmente, na ausência de ANA, a senescência foi muito reduzida, mesmo quando foi utilizada a maior concentração de TDZ (15 μ M). Com a adição da auxina, porém, houve um incremento significativo na senescência em apenas quatro combinações de fitorreguladores, a saber: 10 μ M de TDZ : 0,05 μ M de ANA; 0 μ M de TDZ : 0,1 μ M de ANA; 10 μ M de TDZ : 0,1 μ M de ANA; e 15 μ M de TDZ : 0,1 μ M de ANA, as quais, aparentemente, não compartilham nenhuma relação óbvia. A AS estimada apresentou um valor alto, permitindo que se deposite confiança nos resultados obtidos.

Tabela 3 - Número de folhas com sinais de senescência, em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, ao longo de 28 dias de cultivo em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) e ácido α -naftalenoacético (ANA). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

TDZ (μ M)	Número de folhas com sinais de senescência			
	ANA (μ M)			Média
0	0	0,05	0,1	
0	2,16 aA ¹	1,50 aA	3,00 cB	2,22
5	1,50 aA	1,56 aA	1,19 aA	1,42
10	1,81 aA	3,03 bB	2,16 bA	2,33
15	1,72 aA	2,21 aA	2,16 bA	2,03
Média	1,79	2,08	2,13	2,00
AS ²		0,8496		

¹Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado. ²AS = acurácia seletiva, faixas: $\leq 0,5$ = Baixa; $0,5 < AS \geq 0,7$ = Moderada; $0,7 < AS \geq 0,9$ = Alta; $> 0,9$ = Muito Alta.

Os resultados obtidos no presente ensaio estão em desacordo com estudo relacionado à multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Annona glabra* L. (araticum-do-brejo) cultivados em meio nutritivo WPM (LLOYD; McCOWN, 1981), em que, na ausência de luminosidade, a adição das citocininas [BAP (a 4,44 μ M), TDZ (a 9,08 μ M), CIN (a 9,28 μ M) e zatina - ZEA (a 9,12 μ M)] permitiu uma redução na senescência foliar, sendo que o menor número de folhas senescentes (0,60) foi observado no tratamento que continha CIN, enquanto ZEA proporcionou o maior número de folhas senescentes (2,60), mas que, contudo, não diferiu significativamente dos demais tratamentos (OLIVEIRA et al., 2007).

No que diz respeito ao período de cultivo, aos sete dias de cultivo não foram observadas folhas senescentes (Figura 4), sendo que a senescência manifestou-se, efetivamente, aos 14 dias, independentemente da concentração de TDZ adicionada ao meio nutritivo MS. Entretanto, a partir dos 21 dias o incremento significativo na senescência (Figura 5) foi relacionado à concentração da citocinina, sendo que, na presença de 5 μ M de TDZ, a senescência progrediu mais lentamente comparada às

demais concentrações avaliadas. Este resultado difere de outros relatos, os quais afirmam que elevados níveis de citocininas podem levar ao atraso na senescência (GAN; AMASINO, 1995). No presente ensaio, como a citocinina em questão é TDZ, a qual é considerada uma substância com efeito de citocinina forte, a concentração 5 μ M parece ter sido suficiente no retardo da senescência, uma vez que o aumento nas concentrações (10 ou 15 μ M) não produziu este efeito. Talvez, a utilização de outras fontes de citocininas requereria uma concentração mais alta para produzir o efeito relatado por Gan e Amasino (1995).

Tabela 4 - Número de folhas com sinais de senescência, em brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo MS, em função de diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) e do período de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

TDZ (μ M)	Número de folhas com sinais de senescência				
	Período de cultivo (dias)				Média
	7	14	21	28	
0	0,00 aA ¹	1,75 aB	2,71 bC	4,42 bD	2,22
5	0,04 aA	0,88 aA	1,75 aB	3,00 aC	1,42
10	0,00 aA	1,25 aB	3,13 bC	4,96 bD	2,33
15	0,00 aA	1,46 aB	3,54 bC	3,13 aC	2,03
Média	0,01	1,33	2,78	3,88	2,00
AS ²			0,8496		

¹Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. ²AS = acurácia seletiva, faixas: $\leq 0,5$ = Baixa; $0,5 < AS \leq 0,7$ = Moderada; $0,7 < AS \leq 0,9$ = Alta; $> 0,9$ = Muito Alta.

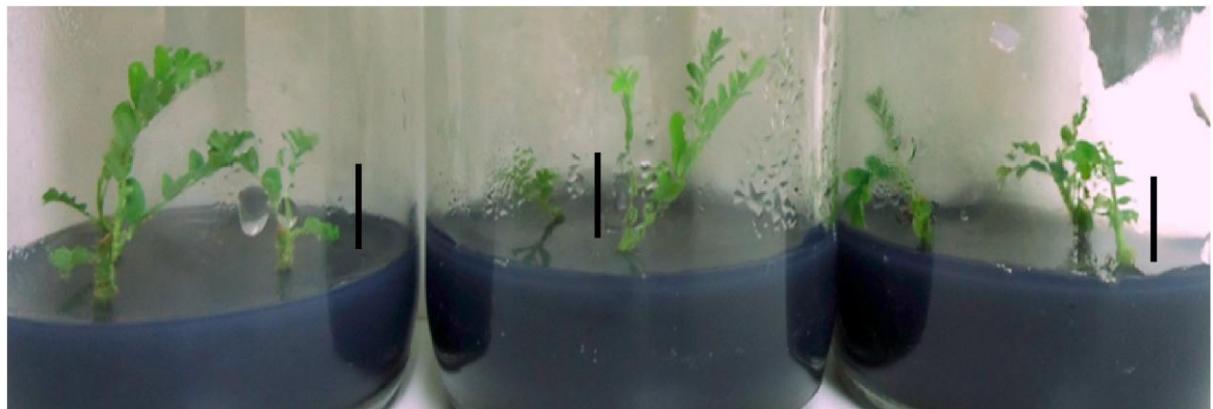


Figura 4 - Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo MS, em diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) sem sinais de folhas senescentes, aos sete dias de cultivo *in vitro*. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.



Figura 5 - Brotações de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert cultivadas em meio nutritivo MS, suplementado com 10 μ M de thidiazuron (TDZ), apresentando folhas com sinais de senescência, aos 21 dias de cultivo *in vitro*. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se inferir que a ocorrência de senescência em brotações de *Peltophorum dubium* é reduzida, mas, conforme o esperado é incrementada pelo tempo de cultivo *in vitro*.

3.7.5 Efeito de 2iP e ANA na senescência foliar *in vitro* de *Peltophorum dubium*

Neste ensaio, houve efeito significativo para a interação entre as concentrações de 2iP e ANA ($p=0,0003$; AS=0,9998) e para a interação entre as concentrações de ANA e o período de cultivo ($p=2,677$; AS=0,9998) (Tabela 5). Observou-se, igualmente, interação tripla ($p=0,0151$; AS=0,6884) entre as concentrações de 2iP, ANA e o período de cultivo (Tabela 6).

Quanto à interação entre as concentrações de ANA e o período de cultivo, verificou-se que, aos sete dias de cultivo, já havia presença de folhas senescentes, contudo, foi a partir dos 21 dias que o período de cultivo começou a exercer influência na intensidade de folhas senescentes, sendo que, a partir deste período, até os 28 dias, houve um aumento no número de folhas com sinais de senescência, em todas as concentrações testadas. Ainda, foi possível observar que, somente aos 28 dias de cultivo, as concentrações testadas tiverem influência na intensidade de folhas com sinais de senescência, de maneira que, na ausência de ANA, bem como, na sua presença na concentração mais baixa ($0,05 \mu\text{M}$) estudada, o número de folhas senescentes foi maior, não diferindo significativamente entre si. Contudo, na concentração $0,1 \mu\text{M}$ da auxina, aos 28 dias de cultivo *in vitro*, a intensidade de folhas senescentes foi menor, quando comparada às demais concentrações de auxina testadas neste mesmo período. Foi observado um reduzido número de folhas senescentes, entretanto, a intensidade de senescência foi aumentando conforme o período de cultivo também aumentou. Ainda, observou-se que, a partir de um determinado período de cultivo, a concentração mais alta de auxina proporcionou uma redução no número de folhas senescentes, demonstrando a eficiência deste fitorregulador no controle da senescência foliar.

Tabela 5 - Número de folhas com sinais de senescência, em brotações de *Peltophorum dubium* cultivadas em meio nutritivo MS, em função de diferentes concentrações de ácido α -naftalenoacético (ANA) e do período de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

ANA (μ M)	Número de folhas com sinais de senescência				
	Período de cultivo (dias)				
	7	14	21	28	Médias
0	0,41 aA ¹	0,31 Aa	1,81 aB	3,81 bC	1,59
0,05	0,35 aA	0,42 aA	1,35 aB	3,84 bC	1,49
0,1	0,31 aA	0,25 aA	1,16 aB	2,38 aC	1,02
Médias	0,36	0,33	1,44	3,34	1,37
AS ²			0,6884		

¹Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado. ²AS = acurácia seletiva, faixas: $\leq 0,5$ = Baixa; $0,5 < AS \geq 0,7$ = Moderada; $0,7 < AS \geq 0,9$ = Alta; $> 0,9$ = Muito Alta.

Em relação à interação entre as concentrações de 2iP, ANA e o período de cultivo, foi observado um reduzido número de folhas senescentes (inferiores a sete em um total de 1497 folhas avaliadas). De acordo com resultados obtidos, aos sete dias de cultivo já havia presença de folhas senescentes, sendo que, até os 14 dias, as concentrações e fontes de fitorreguladores adicionados ao meio nutritivo MS não exerceram influência na ocorrência de senescência foliar.

Contudo, aos 21 dias de cultivo, houve um incremento no número de folhas senescentes, sendo possível observar que, na concentração 0,05 μ M de ANA e na ausência de 2iP, ocorreu o maior número de folhas senescentes (2,63), que não diferiu significativamente da média observada na ausência de ambos os fitorreguladores (2,25). Isso indica que, neste período, a presença de 2iP combinado com 0,05 μ M de ANA, favorece a redução no número de folhas senescentes.

Aos 28 dias de cultivo, foi possível observar que, na presença de ANA a 0,05 μ M e na ausência de 2iP; na presença de ANA a 0,05 μ M combinada com 5 μ M de 2iP; e, também, nos tratamentos em que havia a presença apenas de TDZ (5; 10 ou 15 μ M) ocorreu o maior número de folhas com sinais de senescência.

Provavelmente, há uma relação entre concentrações de 2iP e ANA, de maneira que, na ausência de ANA, a presença de 2iP é responsável pelo aumento no número de folhas senescentes. Por outro lado, em pequenas concentrações de ANA (0,05 μ M), a presença de 2iP mostra-se benéfica ao cultivo *in vitro*, reduzindo o número de folhas senescentes, assim como em concentrações mais elevadas de ANA (0,1 μ M), a presença ou ausência de 2iP, nas concentrações testadas, não interfere no número de folhas senescentes. Este resultado sugere que há um efeito de sinergismo quando 2iP e ANA estão presentes no meio nutritivo simultaneamente, havendo um balanço ideal cujo efeito é a redução no número de folhas senescentes. Entretanto, a AS estimada apresentou um valor moderado, assim, os resultados obtidos devem ser avaliados com certa cautela.

Tabela 6 - Número de folhas com sinais de senescência, em brotações de *Peltophorum dubium* cultivadas em meio nutritivo MS, em função de diferentes concentrações de ácido α -naftalenoacético (ANA), isopenteniladenina (2iP) e do período de cultivo. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

ANA (μ M)	Sete dias				Média
	0	5	10	15	
0	0,25 aA ¹	0,25 aA	0,75aA	0,38 aA	1,59
0,05	0,62 aA	0,57 aA	0,00 aA	0,25 aA	1,49
0,1	0,38 aA	0,38 aA	0,25 aA	0,25 aA	1,02
Média	0,36	0,33	1,44	3,34	1,37
AS ²		0,6884			
14 dias					
ANA (μ M)	2iP (μ M)				Média
	0	5	10	15	
0	0,25 aA ¹	0,25 aA	0,38 aA	0,38 aA	1,59
0,05	0,63 aA	0,28 aA	0,38 aA	0,38 aA	1,49
0,1	0,13 aA	0,00 aA	0,38 aA	0,50 aA	1,02
Média	0,36	0,33	1,44	3,34	1,37
AS ²		0,6884			
21 dias					
ANA (μ M)	2iP (μ M)				Média
	0	5	10	15	
0	2,25 bA ¹	1,25 aA	1,63 aA	2,13 aA	1,59
0,05	2,63 bB	0,43 aA	1,00 aA	1,25 aA	1,49
0,1	0,63 aA	1,75 aA	1,00 aA	1,25 aA	1,02
Média	0,36	0,33	1,44	3,34	1,37
AS ²		0,6884			
28 dias					
ANA (μ M)	2iP (μ M)				Média
	0	5	10	15	
0	2,75 aA ¹	3,88 bB	4,13 aB	4,50 aB	1,59
0,05	6,50 bB	2,71 bA	3,00 aA	3,00 aA	1,49
0,1	2,50 aA	1,50 aA	2,88 aA	2,63 aA	1,02
Média	0,36	0,33	1,44	3,34	1,37
AS ²		0,6884			

¹Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. ²AS = acurácia seletiva, faixas: $\leq 0,5$ = Baixa; $0,5 < AS \leq 0,7$ = Moderada; $0,7 < AS \leq 0,9$ = Alta; $> 0,9$ = Muito Alta.

Da mesma maneira que no ensaio anterior (em que foram testadas diferentes concentrações de TDZ e ANA), de acordo com os resultados obtidos no presente ensaio, pode-se inferir que a ocorrência de senescência em brotações de

Peltophorum dubium é comum no cultivo *in vitro*, mas é incrementada, entre outros fatores, pelo tempo de cultivo. Ratificando este resultado, em outro estudo com *Peltophorum dubium* (BASSAN, 2006), em segmentos apicais caulinares cultivados em meio nutritivo MS, na ausência de fitorreguladores, em que foram testadas diferentes concentrações de sacarose (10 g L⁻¹, 20 g L⁻¹ ou 30 g L⁻¹), foi observado que, a partir de 14 dias de cultivo, houve uma redução no número de explantes estabelecidos. No tratamento com sacarose a 10 g L⁻¹, em que os explantes apresentaram sinais de senescência, o ciclo de *Peltophorum dubium*, nas condições testadas, foi de cinco semanas. Este padrão de comportamento foi observado em todos os experimentos realizados por Bassan (2006).

O processo de senescência *in vitro* pode ser atribuído ao esgotamento da capacidade nutritiva do meio, acúmulo de produtos inibidores resultantes do metabolismo celular e/ou toxidez nos cultivos a longo prazo e pelo aumento na evaporação de água nos frascos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1988). Outro fator responsável pela senescência foliar é o acúmulo de etileno nos frascos, que pode atingir níveis tóxicos, interagindo com os fitorreguladores do meio e alterando o comportamento das culturas, conduzindo a um crescimento desordenado das células (formação de calo) ou, ainda, acelerando a senescência das culturas. Isso também pode explicar as alterações na morfologia foliar e, também, na coloração, observadas nas culturas *in vitro* de *Peltophorum dubium*, comparadas àquelas que ocorrem *ex vitro* (BASSAN, 2006).

3.8 Conclusões

- O emprego da citocinina 2-isopenteniladenina, nas concentrações testadas, na presença de ácido α-naftalenoacético ou em conjunto com ácido α-naftalenoacético e 6-benzilaminopurina não exerce influência na multiplicação *in vitro* de epicótilos contendo o nó cotiledonar de *Peltophorum dubium*.

- Aos 21 dias de cultivo *in vitro* de epicótilos contendo o nó cotiledonar de *Peltophorum dubium*, em condições de temperatura elevada, ocorre expressiva senescência foliar.

- As citocininas 6-benzilaminopurina, cinetina, thidiazuron e isopenteniladenina, nas concentrações testadas (5; 10 ou 15 μ M), não influenciam a multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*.
- Quando a citocinina utilizada é TDZ, é dispensável a utilização da auxina ANA, para que se mantenha controlada a senescência foliar. No entanto, quando a citocinina utilizada é 2iP, a presença de ANA contribui para a redução no número de folhas senescentes.
- De maneira geral, a partir dos 21 dias de cultivo, a auxina e as citocininas utilizadas (ANA, 2iP e TDZ) passam a exercer efeito significativo na ocorrência de senescência foliar, a qual vai depender da combinação dos fitorreguladores.

3.9 Referências bibliográficas

- ALMEIDA, J. L. et al. Indução de brotações em explantes de segmentos de folhas de plântulas de urucueiro em diferentes citocininas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.26, n.1, p.45-49, 1996.
- ARAGÃO, A. K. O. et al. O efeito do BAP (6-Benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de pau-brasil. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 3, p. 339-345, jul./set. 2011.
- BARBOSA, W. et al. Concentrações de 6-Benzilaminopurina no desenvolvimento *in vitro* de embriões de pêssegos e nectarinas precoces. **Bragantia**, Campinas, v. 49, n. 2, p. 233-239, 1990.
- BASSAN, J. S. **Comportamento *in vitro* de canafístula [(*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert)].** 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2006.
- BIASI, L. A. et al. Micropropagação do abacateiro ‘Ouro Verde’ a partir de segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.7, p.1051-1058, jul. 1994.
- CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1998. v 1. p. 183-260.

CARIMI, F. et al. High levels of the cytokinin BAP induce PDC by accelerating senescence. **Plant Science**, Clare, v. 166, n. 4, p. 963-969, Apr. 2004.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p.

CHAVES, A. C. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, nov./dez., 2005.

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

CURTI, A. R. **Contribuições para a micropopulação de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

DAVIES, P. J. (ed.). Plant hormones. Biosynthesis, signal transduction, action. **Kluwer Academic Publishers**. Dordrecht, 2004. 750p.

DEUS, D. A. de et al. Calogênese em *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake em diferentes concentrações de reguladores de crescimento. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 717-719, jul. 2007.

DZAZIO, P. M. et al. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 3, p. 759-764, 2002.

ENCINA, C. L. et al. *In vitro* morphogenesis of juvenile *Annona cherimola* Mill. Bud explants. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 69, n. 6, p. 1053-1059, Nov. 1994.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Morfogênese *in vitro* de brotos de macieira (*Malus domestica* Borkh.) a partir de fragmentos delgados de folhas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 575-581, maio/jun., 2005.

FERREIRA, D. F. **Programa Sisvar: programa de análises estatísticas e planejamento de ensaios**. SISVAR versão 5.1. Lavras: UFLA, 2006. (Software). www.dex.ufla.br/~danielff/softwares.htm

FRÁGUAS, C. B. et al. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 49-55, jan./fev., 2004.

GAN, S.; AMASINO, R. M. Inhibition of Leaf Senescence by Autoregulated Production of Cytokinin. **Science**, Washington, v. 270, p. 1986-1988, 1995.

GENKOV, T.; TSONEVA, P.; IVANOVA, I. Effect of cytokinins on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity in *in vitro* cultures of axillary buds of *Dianthus caryophyllus* L. **Jurnal of Plant Growth Regulation**, Coverage, v. 19. p. 169-172, 1997.

GRAÇA, M. E. C. et al.. Efeitos das citocininas Benzilaminopurina e Thidiazuron, na multiplicação “*in vitro*” de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maid. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.43, p.107-112, jul./dez., 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., GUERRA, M. P; NODARI, REIS, A.; GRANDO, J. L. Comportamento da canafistula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) em viveiro, submetida a diferentes métodos de quebra de dormência e semeadura. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.5, p.1-18, dez.1982.

GUEYE, B.; SAÏD-AHMED, H.; MORCILLO, F.; BORGEL, A.; SANÉ, D.; HILBERT, J. L.; VERDEIL, J. L.; BLERVACQ, A. S. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways?. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.98, n.1, p. 47-58, 2009.

HEDDEN, P.; PHILIPS, A. L. Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 11, p. 130-137, 2000.

LEITZKE, L. N. et al. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 352-360, mar./abr., 2010.

LEMOS, E. E. P.; BLAKE, J. Control of leaf abscission in nodal cultures of *Annona muricata* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 5, p. 721-728, Sept. 1996.

LIM, P. O.; KIM, H. J.; NAM, H. G. Leaf senescence. **Annual Review of Plant Biology**. v. 58, p.115–136, 2007.

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

LUCCHETTA, L.; MANRÍQUEZ, D.; EL-SHARKAWY, I.; FLORES, F. B.; ZOUINE, M.; SANCHEZBEL, P.; GINIES, C.; ROMBALDI, C. V.; PECH, J. C.; LATCHE, A. Biochemical and Catalytic Properties of Three Recombinant Alcohol Acyltransferases of Melon. Sulfur-Containing Ester Formation, Regulatory Role of CoA-SH in Activity, and Sequence Elements Conferring Substrate Preference. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Pelotas, RS, v. 55, p. 5213-5220, 2007.

MANTOVANI, N. C. et al. Regeneração *in vitro* de Louro-Pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2007.

MARTINS, L. M. et al. Micropopragação e conservação de *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. em banco de germoplasma *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 3, p.454-458, 2011.

McCABE, M. S.; GARRATT, L. C.; SCHEPERS, F.; JORDI, W. J. R .M.; STOOPEN, G. M.; DAVELAR, E.; VAN RHIJN, J. H. A., POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Effects of PSAG12-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. **Plant Physiology**, Waterbury, n.127, p. 505-516, 2001.

MORALES, C. F. G.; LOMBARDI, S.R. B.; SOARES, P. F.; FORTES, G. R. de L. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5, n.3, p. 174-177, 1999.

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

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

OLIVEIRA, L. M. de; DAVIDE, A. C.; CARVALHO, M. L. M. de. Avaliação de métodos para quebra da dormência e para a desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 5, Out, 2003.

OLIVEIRA, L. M.; PAIVA, R.; SANTANA, J. R. F. de; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; SILVA, L. C. Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 1, p. 025-030, Abril, 2007.

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

RIBAS, A. F. et al. Misturas vitamínicas na regeneração do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa* Deg.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 2, Abril, 2002.

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

SANTOS, M. R. A. do et al. Determination of callus growth curve in conilon coffee. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 1, p. 133-136, jan.-mar., 2010.

SARTORETTO, L. M. et al. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.861-871, 2008.

STORCK, L. et al. Avaliação da precisão experimental em ensaios de competição de cultivares de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 572-578, maio/jun., 2010.

VEERASAMY, M.; HE, Y.; HUANG, B. Leaf Senescence and Protein Metabolism in Creeping Bentgrass Exposed to Heat Stress and Treated with Cytokinins. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 132, n. 4, p. 467-472, 2007.

4 CAPÍTULO II

EFEITO DE DIFERENTES FITORREGULADORES E EXPLANTES NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Peltophorum dubium* (SPRENGEL)

TAUBERT

4.1 Resumo

Com o objetivo de definir melhores fontes e concentrações de fitorreguladores e tipo de explante que favoreçam a multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*, foram realizados dois ensaios. No primeiro, epicótilos contendo o nó cotiledonar foram utilizados como explantes no cultivo inicial de 30 dias, estudando-se o efeito de diferentes concentrações de TDZ combinadas com diferentes concentrações de ANA; no subcultivo de 30 dias, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de TDZ, combinadas com diferentes concentrações de ANA e dois tipos de explantes (segmentos nodais ou segmentos apicais caulinares). No segundo ensaio, em que, novamente, epicótilos contendo o nó cotiledonar foram utilizados como explantes no cultivo inicial de 30 dias, estudou-se o efeito de diferentes concentrações de 2iP combinadas com diferentes concentrações de ANA; no subcultivo de 30 dias, foi analisado o efeito de diferentes concentrações de 2iP, combinadas com diferentes concentrações de ANA e dois tipos de explantes (segmentos nodais ou segmentos apicais caulinares). Pode-se verificar que a presença de TDZ, ANA e 2iP, nas concentrações testadas, no meio nutritivo MS, não exerce influência na sobrevivência, estabelecimento e número de folhas formadas em *Peltophorum dubium* durante o cultivo *in vitro* inicial, de 30 dias, de epicótilos contendo o nó cotiledonar, observando-se elevadas médias para estas variáveis. Ainda, a associação entre ANA e TDZ tem efeito prejudicial significativo na sobrevivência de explantes de *Peltophorum dubium* durante o primeiro subcultivo de 30 dias em meio nutritivo MS. Esta associação também tem efeito prejudicial significativo no estabelecimento *in vitro* e número de brotos formados em segmentos apicais caulinares de *Peltophorum dubium* durante o primeiro subcultivo de 30 dias em meio nutritivo MS. A presença de 2iP e ANA, nas concentrações testadas, não exerce influência na sobrevivência, estabelecimento, número de brotos e número de folhas formados em *Peltophorum dubium* durante o primeiro subcultivo de 30 dias em meio nutritivo MS.

Palavras-chave: Thidiazuron. Ácido α -naftalenoacético. Isopenteniladenina. Subcultivo.

EFFECT OF DIFFERENT GROWTH REGULATORS AND EXPLANTS IN THE *IN VITRO* MULTIPLICATION OF *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT

4.2 Abstract

In order to define the best sources and concentrations of growth regulators and explant type that favor the *in vitro* multiplication of *Peltophorum dubium*, two assays were conducted. At the first, we studied the effect of different concentrations of TDZ combined with different concentrations of NAA in the initial *in vitro* culture at 30 days which epicotyls containing cotyledonary nodes were used as explants; at 30 days of subculture, we evaluated the effect of different concentrations of TDZ combined with different concentrations of NAA and two types of explants (nodal segments or shoot apical segments). In the second assay, in which again epicotyls containing the cotyledonary nodes were used as explants in the 30 days of initial *in vitro* culture, we studied the effect of different concentrations of 2iP combined with different concentrations of NAA; in the 30 days of subculture was analyzed the effect of different concentrations of 2iP, combined with different concentrations of NAA and two types of explants (nodal segments or shoot apical segments). It can be verified that the presence of TDZ, 2iP and NAA, in tested concentrations in the nutritive medium MS, does not influence survival, establishment and number of leaves formed in *Peltophorum dubium* during the initial *in vitro* culture at 30 days of epicotyls containing the cotyledonary nodes, have been observed high averages for these variables. Further, the association between NAA and TDZ has significant detrimental effect on the survival of *Peltophorum dubium* explants during the first 30 days of subculture in the nutritive medium MS. This association also has significant deleterious effect on *in vitro* establishment and number of new shoots in shoot apical segments of *Peltophorum dubium* during the first subculture of 30 days in the nutritive medium MS. The presence of 2iP and NAA at the tested concentrations, don't have influence on survival, establishment, number of shoots and number of leaves formed in *Peltophorum dubium* during the first subculture of 30 days in the medium MS.

Keywords: Thidiazuron. α -naphthaleneacetic acid. Isopentenyladenine. Subculture.

4.3 Introdução

A espécie florestal nativa *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert pertence à família Fabaceae, sendo conhecida popularmente como canafístula, faveiro, tamboril, dentre outros, aparece com frequência em todo domínio da floresta estacional semidecidual (CARVALHO, 2003; MARCHIORI, 1997). Ocorre naturalmente em regiões da Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul até o Paraná e pelo seu rápido crescimento e rusticidade, é comumente encontrada colonizando pastagens, ocupando clareiras e bordas de matas, sendo também utilizada para a composição de reflorestamentos mistos de áreas degradadas e áreas de preservação permanente (LORENZI, 1992).

Apesar do seu grande potencial, *Peltophorum dubium*, assim como a grande maioria das espécies florestais, é uma espécie praticamente desconhecida do ponto de vista científico, uma vez que ainda são incipientes os estudos referentes à sua propagação vegetativa *in vitro* que permitam avanços no melhoramento genético da espécie. Nesse sentido, são necessários esforços visando à conservação e a ampliação da variabilidade genética desta espécie, o que pode ser viabilizado por meio da cultura de tecidos vegetais (RESCAROLLI; ZAFFARI, 2009).

A cultura de tecidos utiliza-se de técnicas como a micropropagação, uma prática bastante eficiente quando se pretende a produção de mudas em larga escala e a obtenção de matéria-prima de alta qualidade genética e fitossanitária, em curto espaço de tempo (RESCAROLLI; ZAFFARI, 2009). Contudo, para auxiliar no processo de multiplicação *in vitro*, frequentemente, é necessário o suprimento de fitorreguladores, mais especificamente citocininas e auxinas (SOARES et al., 2011). As citocininas pertencem à classe de fitorreguladores responsáveis pela quebra de dominância apical e pelo aumento na taxa de multiplicação, enquanto as auxinas, por sua vez, respondem pela formação da parte aérea, alongamento celular e enraizamento (SRISKANDARAJAH et al., 1982). A concentração e o balanço hormonal citocininas/auxinas são fatores determinantes na diferenciação celular e no padrão de desenvolvimento *in vitro* (GUEYE et al., 2009).

Face ao exposto, o presente estudo objetivou avaliar a influência de fontes e concentrações de citocininas, concentrações de auxina e tipos de explantes na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*.

4.4 Material e métodos

Dois ensaios foram conduzidos no laboratório, sendo que em ambos foram utilizadas sementes de *Peltophorum dubium* coletadas e armazenadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro/Florestas em Santa Maria, RS, provenientes da produção de 2010. Após a aquisição, as sementes permaneceram armazenadas no laboratório em frascos de vidro e acondicionadas em temperatura de 8-10 °C, em refrigerador, até o seu emprego nos ensaios, que foram realizados no ano de 2012.

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

Visando à obtenção de explantes de origem seminal, na germinação *in vitro* as sementes foram inoculadas, em câmara de fluxo laminar, em frascos de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio ágar-água a 0,7 % (m/v), previamente autoclavado por um período de 40 min a 121 °C e 1 atm de pressão. Em cada frasco foram colocadas cinco sementes e, a seguir, foi efetuada sua vedação com papel alumínio. A germinação foi realizada em frascos mantidos em sala de cultivo em temperatura de 25±3 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Quando a maioria das sementes germinou, foram isolados os explantes, que consistiram de epicótilos contendo o nó cotiledonar, com aproximadamente 10 mm de comprimento. No período de subcultivo, foram utilizados, como explantes, segmentos nodais e segmentos apicais caulinares, obtidos a partir das brotações micropagadas. Imediatamente após serem seccionados, os explantes foram inoculados em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sendo utilizados nos ensaios de multiplicação *in vitro* descritos a seguir.

O meio nutritivo MS foi suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar e 1 g L⁻¹ de carvão ativado, sendo também,

acrescentadas as diferentes fontes e concentrações de citocininas e da auxina, conforme o ensaio. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado a 120 °C e 1 atm de pressão por 15 min. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo em temperatura de 25±3 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 20 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias do tipo luz do dia.

Em ambos os ensaios foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo que cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro de 150 mL contendo 30 mL de meio nutritivo e três explantes.

4.4.1 Efeito de thidiazuron (TDZ), ácido α-naftalenoacético (ANA) e diferentes explantes na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*

Neste ensaio foi empregado um arranjo bifatorial 4x3, em que os níveis do fator “A” referiram-se às concentrações de TDZ e os níveis do fator “B”, às concentrações de ANA. Os tratamentos consistiram de 0; 5; 10 ou 15 µM da citocinina TDZ e 0; 0,05 ou 0,1 µM da auxina ANA, totalizando 12 tratamentos com oito repetições cada. Já no subcultivo, foi utilizado um arranjo trifatorial 2x2x2, em que os níveis do fator “A” referiram-se às concentrações de TDZ, os níveis do fator “B”, às concentrações de ANA, e os níveis de “C”, aos explantes utilizados. Os tratamentos consistiram de 0 ou 5 µM de TDZ, 0 ou 0,05 µM de ANA, enquanto os tipos de explantes foram segmentos nodais ou segmentos apicais caulinares, totalizando oito tratamentos com número diferente de repetições (variando de cinco à 10).

4.4.2 Efeito de 2-isopenteniladenina (2iP), ANA e diferentes explantes na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*

Neste ensaio foi utilizado um arranjo bifatorial 4x3, em que os níveis do fator “A” referiram-se às concentrações de 2iP e os níveis do fator “B”, às concentrações

de ANA. Os tratamentos consistiram de 0; 5; 10 ou 15 μM de 2iP e 0; 0,05 ou 0,1 μM de ANA, totalizando 12 tratamentos com oito repetições cada. Já no subcultivo, foi utilizado um arranjo trifatorial $2 \times 2 \times 2$, em que os níveis do fator “A” referiram-se às concentrações de 2iP, os níveis do fator “B”, às concentrações de ANA e os níveis de “C”, aos explantes utilizados. Os tratamentos consistiram de 0 ou 5 μM de 2iP, 0 ou 0,1 μM de ANA e os tipos de explantes, aos segmentos nodais ou segmentos apicais caulinares, totalizando oito tratamentos com número diferente de repetições (variando de cinco à 10).

4.5 Variáveis analisadas

Em ambos os ensaios, aos 30 dias de cultivo *in vitro* foram avaliadas as seguintes variáveis: sobrevivência (%), estabelecimento (%), número de brotos por explante (Nº B/E) e o número de folhas (Nº FO). A sobrevivência foi caracterizada pela coloração verde dos explantes e o estabelecimento, pela emissão de folhas e/ou brotos a partir do explante. Em seguida, os segmentos nodais e segmentos apicais caulinares, oriundos das brotações obtidas nesse cultivo inicial, foram subcultivados em um meio nutritivo fresco de idêntica composição, e, decorridos 30 dias, foram avaliadas as mesmas variáveis descritas anteriormente.

4.6 Análise estatística

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

Para as análises estatísticas utilizou-se o programa SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 5.1 (FERREIRA, 2006).

Adicionalmente, quando o valor de F foi significativo, a precisão dos ensaios foi calculada por meio da acurácia seletiva. Esta estatística corresponde à correlação linear entre os valores genotípicos e fenotípicos, sendo estimada por $AS=(1-1/F)^{1/2}$, em que F é o valor do teste F para genótipo e, quanto maior o seu valor, mais confiáveis são os resultados obtidos (STORCK et al., 2010).

4.7 Resultados e discussão

4.7.1 Efeito de TDZ, ANA e diferentes explantes na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*

Os explantes cultivados apresentaram 100 % de sobrevivência e de estabelecimento, independentemente dos tratamentos utilizados. Em decorrência disso, os fitorreguladores testados podem ser dispensados nesta etapa inicial do cultivo *in vitro* de *Peltophorum dubium*.

Da mesma maneira, em segmentos nodais de *Luehea divaricata* (acoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo WPM (LLOYD; McCOWN, 1981), não houve influência das diferentes concentrações da citocinina BAP (a 22,22; 44,44 ou 66,67 μ M) na sobrevivência e estabelecimento dos explantes, sendo obtida, para ambas as variáveis, uma média geral de 80,85 % (FLÓRES et al., 2011). Igualmente, a combinação entre ANA e BAP, em ápices caulinares de *Jacaratia spinosa* (jaracatiá) cultivados em meio nutritivo MS, não apresentou efeito significativo para a sobrevivência dos explantes (58,3 %) nas diferentes concentrações testadas (ANA a 0,54 μ M e BAP a 2,22; 4,44; 6,67 ou 8,89 μ M) (MARANA et al., 2009).

Em relação ao número de brotos formados, houve efeito significativo apenas para o fator principal concentrações de ANA ($p=0,0330$; $AS=0,8476$) e a AS estimada foi alta, o que permite depositar confiança nos resultados obtidos. Observou-se que, na ausência da auxina, houve formação de 5 brotos por explante, entretanto, na presença de 0,05 μ M e de 0,1 μ M formaram-se as maiores

quantidades de brotos por explante, 5,78 e 5,47, respectivamente, as quais não diferiram significativamente entre si. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de que a adição de ANA ao meio nutritivo provocou alterações positivas no balanço hormonal endógeno, favorecendo a formação de brotos. Pode-se considerar que o incremento obtido no número de brotos, mesmo que pequeno, com a adição da auxina, pode ser considerado satisfatório em função dos resultados obtidos até o momento, e por tratar-se de uma espécie florestal nativa que ainda não foi submetida a um processo de melhoramento genético.

Em segmentos nodais de *Caryocar brasiliense* (pequizeiro) cultivados em meio nutritivo WPM, foram obtidos, em média, 6 brotos por explante na presença de 0,05 mg L⁻¹ (0,27 µM) de ANA combinado com 0,75 mg L⁻¹ (3,33 µM) de BAP (SANTOS et al., 2006), valor próximo ao observado no presente ensaio. Entretanto, em segmentos caulinares de *Rubus idaeus* L. (amoreira-preta) cv. Tupy cultivados em meio nutritivo MS, formaram-se 0,67 e 0,87 brotos por explante, nas concentrações 2 e 4 µM de BAP, respectivamente, até a terceira semana de multiplicação (ERIG et al., 2002), valores inferiores aos obtidos para *Peltophorum dubium* no presente ensaio.

Para o número de folhas não houve efeito dos fatores principais concentrações de TDZ ($p=0,3679$) e de ANA ($p=0,1996$) e nem interação significativa entre estes fatores ($p=0,3520$), sendo observada uma elevada média geral (13,96). Houve uma satisfatória formação de folhas e o resultado indicou que a presença de TDZ combinado com ANA, ou o emprego isolado de ambos os fitorreguladores, não exercearam influência sobre esta variável, podendo, neste caso, ser dispensados, semelhantemente ao que foi observado para o número de brotos (em que apenas o fator concentração de ANA teve efeito significativo), que está diretamente relacionada ao número de folhas. Em segmentos nodais de *Rubus* spp. (amoreira-preta) cvs. Tupy e Brazos cultivados em meio nutritivo MS, o incremento nas concentrações de ANA proporcionou um aumento no número de folhas até 1 mg L⁻¹ (5,37 µM) de ANA e a partir desta concentração houve um decréscimo (VILLA et al., 2008).

Para a porcentagem de explantes que sobreviveram (Tabela 7), no período de subcultivo, houve efeito significativo para a interação ($p=0,0406$; AS=0,8779) entre as concentrações de TDZ e ANA, indicando que os fatores não são independentes. Foi possível observar que, na ausência de TDZ, tanto na ausência de ANA quanto

na presença de 0,05 μ M, houve 100 % de sobrevivência dos explantes. Da mesma maneira, com a adição de TDZ e na ausência de ANA, a sobrevivência dos explantes não foi reduzida significativamente (98,3 %). Por outro lado, com 5 μ M de TDZ, na presença de ANA, foi observada a menor porcentagem de sobrevivência (82,4 %), sugerindo que TDZ combinado a ANA prejudica a sobrevivência dos explantes. Nesse sentido, é possível inferir que, para a sobrevivência dos explantes, no primeiro subcultivo de *Peltophorum dubium*, podem ser igualmente utilizados segmentos nodais e segmentos apicais caulinares e que tanto TDZ quanto ANA são dispensáveis. Novamente, a AS estimada foi alta, indicando que os resultados obtidos são confiáveis. Este resultado difere do obtido no cultivo inicial em que não houve efeito significativo dos fatores estudados, provavelmente decorrente das condições fisiológicas dos explantes utilizados e do balanço hormonal endógeno, que, assim como o vigor dos explantes, é alterado ao longo dos subcultivos (HINOJOSA, 2005). Em virtude disso, a combinação das duas classes de fitorreguladores (citocininas x auxinas) interferiu de maneira negativa na sobrevivência dos explantes, provavelmente em consequência de uma interação antagônica entre eles (PINO-NUNES, 2009).

Tabela 7 - Porcentagem de sobrevivência de explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de subcultivo, em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) e ácido α -naftalenoacético (ANA). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

TDZ (μ M)	Sobrevivência (%)		
	ANA (μ M)		Média (%)
	0	0,05	
0	100,0 aA ¹	100,0 aA	100,0
5	98,3 aA	82,4 bB	90,8
Média (%)	99,0	91,4	95,1
AS ²	0,8779		

¹Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. ²AS = acurácia seletiva, faixas: $\leq 0,5$ = Baixa; $0,5 < AS \leq 0,7$ = Moderada; $0,7 < AS \leq 0,9$ = Alta; $> 0,9$ = Muito Alta.

Em relação ao estabelecimento dos explantes, houve efeito significativo para a interação ($p=0,0336$; AS=0,8874) entre todos os fatores estudados (ANA, TDZ e explante), sendo obtido 100 % de estabelecimento quando se utilizaram, como explantes, segmentos apicais caulinares na ausência de ambos os fitorreguladores, média que não diferiu significativamente daquelas observadas na presença de ANA a 0,05 μ M e ausência de TDZ e, também, na ausência de ANA e na presença de TDZ a 5 μ M. Contudo, quando ANA e TDZ estavam presentes a 0,05 μ M e 5 μ M, respectivamente, a porcentagem de estabelecimento destes explantes foi significativamente inferior (61 %) (Tabela 8).

Em contrapartida, quando se utilizaram segmentos nodais como explantes (Tabela 8), observaram-se, no máximo, 96,6 % de estabelecimento *in vitro* dos explantes, quando ambos os fitorreguladores estavam ausentes, média que não diferiu significativamente da menor porcentagem de estabelecimento observada (85,5 %). Dessa maneira, é possível concluir que tanto ANA quanto TDZ, assim como ocorreu para a sobrevivência *in vitro*, podem ser dispensados no estabelecimento de explantes de *Peltophorum dubium*, durante o primeiro subcultivo, bem como, os segmentos apicais caulinares são os tipos de explantes mais adequados nesta etapa do cultivo *in vitro*, pois proporcionam maiores porcentagens de estabelecimento. Ainda, pode-se inferir que, no primeiro subcultivo, quando TDZ e ANA estiveram combinados entre si, o estabelecimento dos segmentos apicais caulinares foi comprometido, pois na presença deste fitorregulador a porcentagem de estabelecimento reduziu-se. Novamente, a AS estimada foi alta, demonstrando alta confiabilidade nos resultados obtidos.

Por outro lado, em outro trabalho, segmentos apicais caulinares e segmentos nodais de *Peltophorum dubium* cultivados meio nutritivo MS, na ausência de fitorreguladores, apresentaram altas médias de sobrevivência e estabelecimento *in vitro*, não diferindo significativamente entre si (BASSAN et al., 2006). Também, em segmentos apicais caulinares e segmentos nodais de *Luehea divaricata* (açoita-cavalo) cultivados em meio nutritivo WPM, na ausência de fitorreguladores, não foram verificadas diferenças significativas entre os explantes para sobrevivência (83,75 %) e estabelecimento *in vitro* (80 %) (LEÓN, 2010).

Tabela 8 - Porcentagem de estabelecimento de segmentos apicais caulinares e segmentos nodais de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de subcultivo, em meio nutritivo MS suplementado com diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) e ácido α -naftalenoacético (ANA). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Segmentos apicais caulinares (%)			
TDZ (μ M)	ANA (μ M)		
	0	0,05	Média (%)
0	100,0 aA ¹	100,0 aA	100,0
5	100,0 aA	61,0 bB	82,0
Média (%)	100,0	80,5	88,8
AS ²	0,8874		
Segmentos nodais (%)			
TDZ (μ M)	ANA (μ M)		
	0	0,05	Média (%)
0	96,6 aA ¹	85,6 aA	90,2
5	85,5 aA	87,1 aA	86,3
Média (%)	90,1	86,3	88,8
AS ²	0,8874		

¹Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. ²AS = acurácia seletiva, faixas: $\leq 0,5$ = Baixa; $0,5 < AS \leq 0,7$ = Moderada; $0,7 < AS \leq 0,9$ = Alta; $> 0,9$ = Muito Alta.

Igualmente, para o número de brotos houve interação significativa ($p=0,0210$; $AS=0,9060$) entre as concentrações de ANA, TDZ e o tipo de explante, sendo que quando se utilizaram segmentos apicais caulinares na presença de ANA a 0,05 μ M combinada com TDZ a 5 μ M (Tabela 9), houve a formação de apenas 1,5 brotos por explante, entretanto, nas demais situações, o número de brotos formados variou entre 2,4 e 3,2, não diferindo significativamente entre si. Esses resultados ratificam os anteriores, obtidos para a sobrevivência e estabelecimento dos explantes, em que, nas condições avaliadas, o emprego de TDZ combinado com ANA não se mostrou benéfico à multiplicação *in vitro*.

Quando os explantes utilizados foram segmentos nodais (Tabela 9), não houve diferença significativa para todos os tratamentos utilizados, sendo que, o maior número de brotos formados foi 2,9. Os resultados sugerem que o emprego de segmentos apicais caulinares é mais apropriado à formação de brotos quando comparado aos segmentos nodais, ao passo que o uso de TDZ pode ser dispensado. A AS estimada foi muito alta, permitindo que se deposite grande confiança nos resultados obtidos. Contudo, o número de brotos formados no período de subcultivo foi inferior aos formados durante o cultivo inicial, sugerindo que o tipo de explante utilizado interferiu na formação de brotos.

Tabela 9 - Número de brotos por explante (NB⁰/E) em segmentos apicais caulinares e segmentos nodais de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 30 dias de subcultivo, em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) e ácido α-naftalenoacético (ANA). Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Segmentos apicais caulinares			
TDZ (μM)	ANA (μM)		Média
	0	0,05	
0	2,8 aA ¹	3,2 aA	3,0
5	2,4 aA	1,5 bB	2,0
Média	2,6	2,3	88,8
AS ²	0,9060		
Segmentos nodais			
TDZ (μM)	ANA (μM)		Média
	0	0,05	
0	2,9 aA ¹	2,6 aA	2,7
5	2,5 aA	2,7 aA	2,6
Média	2,7	2,6	2,6
AS ²	0,9060		

¹Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. ²AS = acurácia seletiva, faixas: ≤ 0,5 = Baixa; 0,5 < AS ≤ 0,7 = Moderada; 0,7 < AS ≤ 0,9 = Alta; > 0,9 = Muito Alta.

Com base nos resultados obtidos tanto para o estabelecimento *in vitro* quanto para o número de brotos por explantes de *Peltophorum dubium*, pode-se afirmar que a interação entre TDZ e ANA foi antagônica quando foram utilizados segmentos apicais caulinares como explantes. Isso pode ser decorrente da maior concentração endógena de auxinas existentes em segmentos apicais caulinares comparativamente aos segmentos nodais, resultando em respostas diferenciadas à aplicação exógena de fitorreguladores. Outro fator que pode ter influência sobre os resultados obtidos é o fato de que os segmentos apicais caulinares, às vezes, apresentam maior capacidade de crescimento que os demais tipos de explantes que estão sob o efeito da dominância apical (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Na organogênese *in vitro* de *Mallus* sp. (porta-enxerto de macieira M9), por meio da utilização de diferentes explantes (entrenós ou folhas) e fitorreguladores (ANA a 0,54 μ M e BAP a 4,44; 8,89 ou 13,33 μ M), cultivados em meio nutritivo MS, foi verificado um número significativamente maior de brotações (35 %) quando foram utilizados, como explantes, entrenós mantidos no escuro e na presença de BAP a 4,44 μ M quando comparado com os demais tratamentos (SILVA et al., 2005). Em diferentes tipos de explantes (folha escarificada, segmento foliar e entrenós) de *Malus domestica* (macieira) cv. Gala, inoculados em meio nutritivo MS, a maioria das brotações formadas com a utilização de TDZ (a 18,16 a 22,71 μ M) foram muito pequenas, agrupadas e vitrificadas (SCHUCH; PETERS, 2002). A maior proliferação de brotos (7,3) em *Kielmeyera coriacea* (pau-santo), foi observada em segmentos nodais cultivados em meio nutritivo MS, quando comparados com segmentos apicais (4,3), ambos na presença de BAP a 0,5 mg L⁻¹ (2,22 μ M) (PINTO et al., 1994) e na ausência de ANA. Em segmentos caulinares de *Hancornia speciosa* (mangabeira) cultivados em meio nutritivo WPM, TDZ (a 9,08 μ M) propiciou a menor proliferação de brotos (1,7 por explante) quando comparado com BAP a 8,89 μ M (1,98 por explante) ou CIN a 9,29 μ M (1,92 por explante) os quais, ao longo da cultura, apresentaram-se mal formados, com caules retorcidos e folhas atípicas. A formação de menor número de brotos com a utilização de TDZ pode estar relacionada ao fato desta citocinina ser mais ativa biologicamente que as demais (SOARES et al., 2011), podendo manifestar-se como inibidor do crescimento, quando utilizada em altas concentrações (RIBEIRO et al. 2010). Em *Bauhinia cheilantha* (pata-de-vaca), o segmento nodal emitiu maior número de brotos (4,3) em meio nutritivo WPM suplementado com 1,0 mg L⁻¹ (4,54 μ M) de TDZ, formando 1,6 vezes mais brotos

que a maior média observada em segmento cotilenodar (2,6) nas mesmas condições (GUTIÉRREZ et al., 2011).

Em relação ao número de folhas não houve efeito significativo para os fatores principais estudados concentrações de ANA ($p=0,7646$), concentrações de TDZ ($p=0,3702$), tipo de explante ($p=0,5419$) e nem para interação ($p=0,1066$), sendo obtida uma média geral de 7,51 folhas por explante. Dessa maneira, TDZ e ANA, combinados entre si ou isolados, podem ser dispensados quando o objetivo é incrementar a formação de folhas, e tanto segmentos nodais quanto segmentos apicais caulinares podem ser utilizados como explantes no primeiro subcultivo de *Peltophorum dubium*. O número de folhas formadas no primeiro subcultivo foi inferior ao número de folhas observadas no cultivo inicial (13,96), sendo que este resultado pode ser decorrente do emprego de explantes diferentes daqueles utilizados no cultivo inicial (epicótilos contendo o nó cotiledonar), os quais, pela juvenilidade, são mais eficientes que segmentos apicais caulinares e segmentos nodais.

Em segmentos nodais de *Rubus* spp. (amoreira-preta) cv. Ébano cultivados em meio nutritivo MS, foi possível obter, em média, 14,83 folhas na presença de 6,0 mg L⁻¹ (17,32 µM) de ácido giberélico (GA₃) e na ausência de ANA (VILLA et al., 2008). Já segmentos cotiledonares de *Parapiptadenia rigida* (angico-vermelho) cultivados em meio nutritivo ½ WPM, apresentaram maior número de folhas (2,90) quando comparados com segmentos nodais na presença de 0,50 mg L⁻¹ (2,32 µM) de CIN ou BAP (2,22 µM) (KIELSE et al., 2009) e na ausência de ANA.

4.7.2 Efeito de 2iP, ANA e diferentes explantes na multiplicação *in vitro* de *Peltophorum dubium*

Em relação à sobrevivência *in vitro* dos explantes, não houve efeito significativo para os fatores principais concentrações de 2iP ($p=0,5055$), concentrações de ANA ($p=0,9658$) e nem interação significativa entre eles ($p=0,6599$), sendo observada uma elevada média (95,1 %). Assim como nos resultados obtidos no ensaio anterior para a sobrevivência, também neste foi observada uma média alta, o que demonstra que a utilização desses fitorreguladores é dispensável nesta fase do cultivo inicial *in vitro* de *Peltophorum dubium*. Da

mesma maneira que o resultado obtido no presente ensaio, em segmentos nodais de *Vaccinium ashei* Reade (mirtilo) cv. Flórida cultivados em meio nutritivo WPM, foi obtida uma média de 88,64 % de sobrevivência aos 35 dias de cultivo *in vitro*, independentemente dos fitorreguladores (24,6 μ M de 2iP, 2,68 μ M de ANA ou 1,44 μ M de GA₃) adicionados ao meio nutritivo (ERIG; SCHUCH, 2005).

Igualmente, para o estabelecimento *in vitro* dos explantes, não houve efeito significativo para ambos os fatores, concentrações de 2iP ($p=0,8107$) e concentrações de ANA ($p=0,7505$) e nem interação significativa ($p=0,7346$) entre os fatores, sendo observada uma média elevada (93,64 %). Assim, pode-se inferir que o uso destes fitorreguladores, isolados ou combinados entre si, é dispensável para a sobrevivência e estabelecimento *in vitro* de explantes de *Peltophorum dubium* durante o cultivo inicial.

Em segmentos nodais de *Vaccinium ashei* Reade (mirtilo) cv. Flórida cultivados em meio nutritivo WPM, foi obtida uma média de 70,74 % de estabelecimento aos 35 dias de cultivo *in vitro*, quando 24,6 μ M de 2iP foram adicionados ao meio nutritivo, na ausência de ANA. O estabelecimento reduziu-se para 43,21 % quando, além de 24,6 μ M de 2iP, foram adicionados 2,68 μ M de ANA ao meio nutritivo, média que não diferiu significativamente daquela obtida no tratamento testemunha (ausência de 2iP e ANA), que foi de 42,26 % (ERIG; SCHUCH, 2005). Em segmentos apicais caulinares de *Peltophorum dubium* cultivados em meio nutritivo MS suplementado com ANA (a 0,05 μ M ou 0,5 μ M), BAP (a 4,4 μ M ou 8,8 μ M) ou GA₃ (a 0,2 μ M), foi observado 100 % de sobrevivência dos explantes em todos os tratamentos testados. Contudo, houve diferenças em relação ao estabelecimento, de maneira que os tratamentos com BAP a 4,4 μ M associados ou não a 0,2 μ M de GA₃ promoveram maior estabelecimento (BASSAN, 2006).

Em relação ao número de brotos e número de folhas, não houve efeito significativo para os fatores principais concentrações de 2iP ($p=0,5053$ e $p=0,8674$ respectivamente), concentrações de ANA ($p=0,3317$ e $p=0,5028$ respectivamente) e nem interação significativa ($p=0,5561$ e $p=0,8192$ respectivamente). Os valores médios obtidos para estas variáveis foram iguais a 4,4 brotos e 15,8 folhas por explante, o que indica que a espécie é responsiva ao cultivo *in vitro*, sem a necessidade de maiores alterações no meio nutritivo básico. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que, assim como ocorreu com a sobrevivência e

estabelecimento *in vitro*, o uso de 2iP e ANA, nas condições testadas, pode ser dispensado na formação de brotos e folhas a partir de epicótilos contendo o nó cotiledonar de *Peltophorum dubium*, implicando em praticidade e economia no cultivo *in vitro*.

Igualmente aos resultados obtidos no presente ensaio, em segmentos cotiledonares e nodais de *Parapiptadenia rigida* (angico-vermelho) cultivados em meio nutritivo ½ WPM, a adição das citocininas BAP ou CIN, em diferentes concentrações e na ausência de ANA, não exerceu influência sobre a indução de brotos (KIELSE et al., 2009). De maneira diferente ao observado no presente ensaio, o menor número de brotos formados (1,2) em segmentos caulinares de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) cultivados em meio nutritivo MS ocorreu na ausência de CIN, sendo que, à medida que foi aumentada a concentração do fitorregulador, aumentou o número de brotos formados, e a melhor resposta (3,0) foi obtida quando foram utilizados 23,23 μ M da citocinina (NICIOLI et al., 2007). Em relação ao número de folhas, em segmentos nodais de *Luehea divaricata* (açoita-cavalo) cultivados em meio WPM, houve efeito inibitório de BAP (a 22,22; 44,44 ou 66,67 μ M) em que as concentrações mais elevadas geraram um menor número de folhas (FLÓRES et al., 2011), sugerindo que pode existir uma concentração ideal em que a citocinina não exerce efeito inibitório na formação de folhas. Em ápices caulinares de *Peltophorum dubium* cultivados em meio nutritivo MS suplementado com ANA (a 0,05 μ M ou 0,5 μ M), BAP (a 4,4 μ M ou 8,8 μ M) ou GA₃ (a 0,2 μ M), houve interação significativa entre os fatores BAP e ANA, sendo observada uma média superior de folhas com a presença de 4,4 μ M da citocinina e na ausência da auxina (BASSAN, 2006).

Da mesma maneira que no cultivo inicial, para a sobrevivência *in vitro* dos explantes durante o subcultivo, não houve efeito significativo para os fatores concentrações de 2iP ($p=0,1429$), concentrações de ANA ($p=0,3181$), tipo de explante ($p=0,1650$) e nem para a interação entre eles ($p=0,2806$), sendo observada uma média alta de sobrevivência (95,7 %). Dessa maneira, podem ser utilizados como explantes, tanto segmentos apicais caulinares quanto segmentos nodais e o uso de 2iP e ANA, combinados ou isolados, pode ser dispensado no primeiro subcultivo de *Peltophorum dubium*. Isso representa vantagens para o cultivo *in vitro* da espécie, uma vez que amplia as possibilidades de utilização de explantes e dispensa o acréscimo de fitorreguladores, sem prejuízos para os resultados obtidos.

Houve efeito significativo apenas para o fator principal tipo de explante ($p=0,0000$; AS=0,9759) em relação ao estabelecimento *in vitro*, sendo que, os segmentos apicais caulinares proporcionaram a maior porcentagem de estabelecimento (95,8 %) quando comparados aos segmentos nodais (71,3 %) e, como a AS estimada apresentou um valor elevado, os resultados obtidos são muito confiáveis. Sendo assim, no período de subcultivo, quando se pretendem estabelecer brotações de *Peltophorum dubium*, o emprego de segmentos apicais caulinares é mais adequado quando comparado aos segmentos nodais, por apresentarem maior vigor, que resulta em crescimento mais rápido e, também, por que os segmentos apicais caulinares não estão sob o efeito da dominância apical, presente nos segmentos nodais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Em brotações de *Vaccinium ashei* Read (mirtilo) cvs. Delite e Woodard cultivadas em meio nutritivo WPM, o uso de ácido indolbutírico (AIA) a 5,7 μ M, proporcionou, em média, 58,6 % de sobrevivência e 43,1 % de estabelecimento *in vitro* dos explantes, contudo, na ausência deste fitorregulador, houve redução na sobrevivência (31,5 %) e estabelecimento (17,4 %) dos explantes (SILVA et al., 2008). Ainda que a presença de AIA tenha proporcionado maiores porcentagens de sobrevivência e estabelecimento dos explantes, as médias foram inferiores às obtidas no presente ensaio, em que não houve efeito dos fitorreguladores utilizados.

Da mesma maneira que para o estabelecimento dos explantes, para o número de brotos houve efeito significativo apenas para o fator principal tipo de explante ($p=0,0135$; AS=0,9179) e a AS estimada apresentou um valor elevado, podendo-se confiar nos resultados obtidos. Novamente, os segmentos apicais caulinares apresentaram o melhor resultado (2,8 brotos por explante) quando comparados aos segmentos nodais (2,3 brotos por explante), ratificando os resultados obtidos anteriormente. Os números de brotos observados no primeiro subcultivo foram inferiores ao número de brotos formados no cultivo inicial (4,4), podendo-se atribuir este resultado ao tipo de explantes utilizados. No cultivo inicial foram empregados epicótilos contendo o nó cotiledonar, que provavelmente apresentavam maior vigor e competência para retomar o crescimento, quando comparados aos segmentos nodais e segmentos apicais caulinares utilizados no subcultivo.

Em segmentos caulinares de *Hancornia speciosa* (mangabeira) cultivados em meio nutritivo WPM, a formação de brotações (1,98, 1,70 ou 1,92 respectivamente)

ocorreu em todos os tratamentos testados (BAP, TDZ ou CIN respectivamente, todos na concentração de 2 mg L⁻¹), mesmo na ausência dos fitorreguladores (1,58) (SOARES et al., 2011). De maneira diferente aos resultados obtidos no presente ensaio, em segmentos nodais de *Rubus idaeus* L. (amoreira-preta) cv. Brazos houve formação de 2,63 brotos por explante em meio nutritivo WPM quando foi acrescido 1,0 mg L⁻¹ (4,44 µM) de BAP (VILLA et al., 2006).

Assim como para o estabelecimento *in vitro* e o número de brotos, para o número de folhas, houve efeito significativo apenas para o fator principal tipo de explante ($p=0,0000$; AS=0,9892), em que, novamente, os segmentos apicais caulinares foram superiores, sendo responsáveis pela formação de maior número de folhas (5,5) quando comparados com os segmentos nodais (3,0). A AS estimada foi elevada, permitindo depositar alta confiança nos resultados obtidos. Da mesma maneira que ocorreu para o número de brotos, houve uma redução no número de folhas formadas no primeiro subcultivo em comparação ao cultivo inicial (15,8). Esta redução pode ser atribuída ao emprego de segmentos apicais caulinares e segmentos nodais ao invés de epicótilos contendo o nó cotiledonar.

Em explantes caulinares de *Hancornia speciosa* (mangabeira) cultivados em meio nutritivo WPM, maior número de folhas (18,86) foi obtido na presença de BAP (a 8,89 µM) quando comparado com CIN a 9,29 µM (9,80 folhas) e TDZ a 9,08 µM (10,90 folhas) (SOARES et al., 2011), demonstrando que, dependendo da espécie, combinações, fontes e concentrações de fitorreguladores, os resultados obtidos são diferenciados, sendo necessário ajustes de acordo com a espécie e o objetivo do estudo.

4.8 Conclusões

- A presença de TDZ, ANA e 2iP, nas concentrações testadas, no meio nutritivo MS, não exerce influência na sobrevivência e estabelecimento *in vitro*, e no número de folhas formadas em *Peltophorum dubium* durante o cultivo *in vitro* inicial, de 30 dias, de epicótilos contendo o nó cotiledonar, observando-se elevadas médias para estas variáveis.

- A associação entre ANA e TDZ tem efeito prejudicial significativo na sobrevivência de explantes de *Peltophorum dubium* durante o primeiro subcultivo de 30 dias em meio nutritivo MS. Ainda, esta associação, tem efeito prejudicial significativo no estabelecimento *in vitro* e número de brotos formados em segmentos apicais caulinares de *Peltophorum dubium* durante o primeiro subcultivo de 30 dias em meio nutritivo MS.

- A presença de 2iP e ANA, nas concentrações testadas, não exerce influência na sobrevivência e estabelecimento *in vitro*, número de brotos e número de folhas formados em *Peltophorum dubium* durante o primeiro subcultivo de 30 dias em meio nutritivo MS.

4.9 Referências

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

BASSAN, J. S.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras.** Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p.

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

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

FERREIRA, D. F. **Programa Sisvar: programa de análises estatísticas e planejamento de ensaios.** SISVAR versão 5.1. Lavras: UFLA, 2006. (Software). www.dex.ufla.br/~danielff/softwares.htm

FLÔRES, A. V.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; CUNHA, A. C. M. C. M. da; GOLLE, D. P.; BASSAN, J. S. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 175-182, jan.-mar., 2011.

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

GUEYE, B.; SAÏD-AHMED, H.; MORCILLO, F.; BORGEL, A.; SANÉ, D.; HILBERT, J. L.; VERDEIL, J. L.; BLERVACQ, A. S. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways?. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.98, n.1, p. 47-58, 2009.

GUTIÉRREZ, I. E. M. de; NEPOMUCENO, C. F.; LEDO, C. A. da S.; SANTANA, J. R. F. de. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.2, p.260-265, fev, 2011.

KIELSE, P.; FRANCO, E. T. H.; PARANHOS, J. C.; LIMA, A. P. S. de. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.4, p.1098-1104, jul, 2009.

LEÓN, E. A. B. **Germinação, estabelecimento, regeneração e calogênese *in vitro* em explantes de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.).** 61 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1992. v.1, 161 p.

MARANA, J. P.; MIGLIORANZA, E.; FARIA, R. T. de. Estabelecimento *in vitro* de *Jacaratia spinosa* (Aubl.) ADC. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 271-274, abr./jun. 2009.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas:** leguminosas. Santa Maria: UFSM, 1997. 200p.

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

NICOLI, P. M.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C., SANTANA, J. R. F. de; SILVA, L. C.; SILVA, D. P. C. da; PORTO, J. M. P. Ajuste do processo de micropropagação do barbatimão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, Junho, 2008 .

PINTO, J. E. B. P.; ARELLO, E. F.; PINTO, C. A. B.; BARBOSA, M. H. P. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 867-873, jun. 94.

RESCAROLLI, C. L. S.; ZAFFARI, G. R. Produção de mudas de *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Sm. através da cultura de tecidos vegetais *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.11, n.2, p.190-195, 2009.

RIBEIRO, C. S. N.; SILVA, H.; SANTOS, J. W. dos; CARVALHO, J. M. F. C. Efeito do thidiazuron na micropropagação *in vitro* de dois genótipos de mamona via organogênese. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n.4, p. 366-371, 2010.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. de. SILVA, D. P. C. da; MARTINOTTO, C.; SOARES, L. P.; PAIVA, P. D. de O. Micropropagação de pequi (Caryocar brasiliense Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 293-296, Agosto, 2006.

SCHUCH, M. W.; PETERS, J. P. Regeneração de brotações de macieira (*Malus domestica*, Borkh.) cv. Gala. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 2, p. 301-305, Agosto, 2002.

SILVA, L. C. da.; SCHUCH, M. W.; AFONSO, A. P. S.; SOUZA, J. A. de.; SOARES, A. P., SCHIRMBECK, E. Explante, citocinina e luz: fatores que afetam a organogênese de porta enxerto de macieira cultivar M-9. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 3, p. 365 -367, jul-set, 2005.

SILVA, L. C. da.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A. de; ERIG, A. C.; ANTUNES, L. E. C. Tipo de ramo e efeito do ácido indol acético (AIA) no estabelecimento *in vitro* de três cultivares de mirtilo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.522-525, mar-abr, 2008.

SOARES, F. P.; PAIVA, R. ALVARENGA, A. A. de; NERY, F. C.; VARGAS, D. P.; SILVA, D. R. G. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 152-157, jan./fev., 2011.

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

STORCK, L. et al. Avaliação da precisão experimental em ensaios de competição de cultivares de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 572-578, maio/jun., 2010.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; ASSIS, F. A. de; PIO, L. A. S.; ASSIS, G. A. de. Crescimento *in vitro* de amoreira-preta: efeito de reguladores de crescimento e da cultivar. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1754-1759, nov./dez., 2008.

VILLA, F.; FRÁGUAS, C. B.; DUTRA, L. F.; PIO, L. A. S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cultivar Brazos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 266-270, mar./abr., 2006.

5 CAPÍTULO III

INDUÇÃO À CALOGÊNESE EM *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT: EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D, LUMINOSIDADE E DIFERENTES EXPLANTES

5.1 Resumo

O presente estudo objetivou avaliar o efeito de diferentes explantes (segmentos cotiledonares, hipocótilos e segmentos radiculares), concentrações de 2,4-D (a 10, 20 ou 40 μ M) e do regime luminoso (presença ou ausência de luz) na formação de calos em *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. Os explantes foram cultivados em meio nutritivo MS e foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado. Independentemente do regime luminoso, os explantes oriundos de segmentos cotiledonares e hipocótilos são os mais adequados à formação de calos (100 %). A calogênese é maximizada na presença de 20 μ M de 2,4-D em segmentos cotiledonares e hipocótilos. Em segmentos cotiledonares, tanto a calogênese quanto a oxidação fenólica são maximizadas a 20 μ M de 2,4-D. Na ausência de 2,4-D os hipocótilos são mais eficientes na calogênese. A oxidação fenólica está presente, mas de maneira geral, não inviabilizou a formação de calos, principalmente em segmentos cotiledonares e hipocótilos. Ocorrem 100% de formação de raízes em segmentos cotiledonares, na presença de luz e em meio nutritivo suplementado com 40 μ M de 2,4-D; na ausência de luz e presença de 20 μ M da auxina, a rizogênese é também satisfatória.

Palavras-chave: Auxina. Cultura de tecidos. Luminosidade. Organogênese indireta.

THE CALLUS INDUCTION IN *Peltophorum dubium* (SPRENGEL) TAUBERT: EFFECT OF 2.4-D CONCENTRATION, LIGHT AND DIFFERENT EXPLANTS

5.2 Abstract

This study aimed to evaluate the effect of different explants (cotyledonary segments, hypocotyls and root segments), concentrations of 2.4-D (10, 20 or 40 μ M) and light regime (presence or absence of light) in the formation of calli on *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. The explants were cultured in the nutritive medium MS and it was used completely randomized design. Regardless of the light regime, the explants derived from hypocotyls and cotyledonary segments are most suitable for callus formation (100%). Callus formation is maximized in the presence of 20 μ M of 2.4-D in cotyledonary segments and hypocotyl. In cotyledonary segments, both callus formation as phenolic oxidation is maximized at 20 μ M of 2.4-D. In the absence of 2.4-D hypocotyl are more efficient in callus formation. The phenolic oxidation is present, but in general, does not impair the formation of callus, especially in cotyledonary segments and hypocotyls. Occur 100% of root formation in cotyledonary segments in the presence of light and nutritive medium supplemented with 40 μ M of 2.4-D; in the dark and in the presence of auxin at 20 μ M rooting is also satisfactory.

Keywords: Auxin. Tissue culture. Luminosity. Indirect organogenesis.

5.3 Introdução

A espécie florestal nativa *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert (canafístula), pertencente à família Fabaceae, é considerada promissora devido ao valor econômico da sua madeira e pela grande diversidade de uso (paisagismo, recuperação de áreas degradadas, marcenaria, reflorestamentos, etc.) (LORENZI, 1992; MATTEI; ROSENTHAL, 2002). Para a produção de mudas desta espécie podem ser utilizadas técnicas de micropropagação, que são alternativas para a obtenção de plantas em larga escala e de material vegetativo de boa qualidade fitossanitária (THORPE et al., 1991).

A produção de mudas por meio da micropropagação pode ser obtida via organogênese direta ou indireta. Na organogênese direta, a formação de órgãos não passa pela fase de calo, contudo, na organogênese indireta, ocorre obrigatoriamente a formação de calos, os quais originarão os diferentes órgãos (DEUS et al., 2007; SINNOTT, 1960). A calogênese pode determinar as condições de cultivo que os explantes de determinadas espécies requerem para o seu crescimento e sobrevivência, estudos ligados ao desenvolvimento celular e exploração de produtos oriundos do metabolismo secundário (LANDA, 2000).

A formação de calos ocorre, dentre outros fatores, pela presença ou ausência de luz, pelo tipo de explante utilizado e, principalmente, por meio da ação endógena do balanço entre auxinas e citocininas (DEUS et al., 2007; SINNOTT, 1960). As citocinas e auxinas, combinadas entre si ou isoladas, são os fitorreguladores utilizados para a obtenção de calos. Dentre as auxinas existentes, o ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) e o ácido α -naftalenoacético (ANA) são as mais frequentemente empregadas, sendo que 2,4-D tem sido mais utilizado na indução de calos e em culturas em suspensão, enquanto ANA é usado quando a organogênese é requerida (COSTA et al., 2008). Em relação às citocininas, thidiazuron (TDZ) é a mais empregada, pois estimula a divisão celular (NOGUEIRA et al., 2007).

Frente ao exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D, diferentes explantes e distintos regimes luminosos, na indução de calos em *Peltophorum dubium*.

5.4 Material e métodos

Para este ensaio foram utilizadas sementes de *Peltophorum dubium* coletadas e armazenadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro/Florestas em Santa Maria, RS, provenientes da produção de 2010. Após a aquisição, as sementes permaneceram armazenadas no laboratório em frascos de vidro e acondicionadas em temperatura de 8-10 °C, em refrigerador, até o seu emprego no ensaio, que foi realizado no ano de 2012.

Inicialmente, as sementes foram submetidas à superação de dormência por meio de escarificação mecânica com lixa nº 100 na região oposta ao embrião. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas superficialmente por imersão em solução de etanol a 70 % (v/v) por 30 s e, após, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2 % (v/v) por 15 min, passando, então, por triplo enxágue em água estéril. Visando à obtenção de explantes de origem seminal, na germinação *in vitro* as sementes foram inoculadas, em câmara de fluxo laminar, em frascos de vidro com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio ágar-água a 0,7 % (m/v), previamente autoclavado por um período de 40 min a 121 °C e 1 atm de pressão. Em cada frasco foram colocadas cinco sementes e, a seguir, foi efetuada sua vedação com papel alumínio. A germinação foi conduzida e os explantes foram mantidos em sala de cultivo em temperatura de 25±3 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia.

Quando a maioria das sementes germinou, foram isolados os explantes (Figura 6A), que consistiram de segmentos cotiledonares (com aproximadamente 1 cm), segmentos radiculares (1,5 cm) e hipocótilos (1,8 cm) (Figura 6B). Imediatamente após serem seccionados, os explantes foram inoculados em meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) em câmara de fluxo laminar, sendo utilizados no ensaio descrito a seguir. Ao meio nutritivo foram acrescidas 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar, bem como as diferentes concentrações da auxina. O pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, o meio nutritivo foi autoclavado a 120 °C e 1 atm de pressão por 15 min. Os frascos foram vedados com papel alumínio e mantidos em sala de cultivo em temperatura de 25±3 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

$\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias do tipo luz do dia. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco de vidro de 150 mL contendo 30 mL de meio nutritivo e três explantes.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo trifatorial 4x3x2, em que os níveis do fator “A” referiram-se às concentrações de 2,4-D, os níveis do fator “B”, aos diferentes explantes utilizados e, os níveis de “C”, à presença ou ausência de luz. Os explantes foram isolados de plantas obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes (como anteriormente descrito) e, a seguir, inoculados no meio nutritivo, o que ocorreu em câmara de fluxo laminar. Os tratamentos consistiram de 0; 10; 20 ou 40 μM de 2,4-D adicionados ao meio nutritivo em que os diferentes explantes (segmentos cotiledonares, hipocótilos ou segmentos de raiz) foram cultivados, na presença de 16 h de luz ou no escuro, totalizando 24 tratamentos com cinco repetições cada. Decorridos 15 dias de cultivo *in vitro* foram avaliadas as seguintes variáveis: formação de calo, formação de raízes e oxidação fenólica (escurecimento dos explantes) – todas expressas em porcentagem.

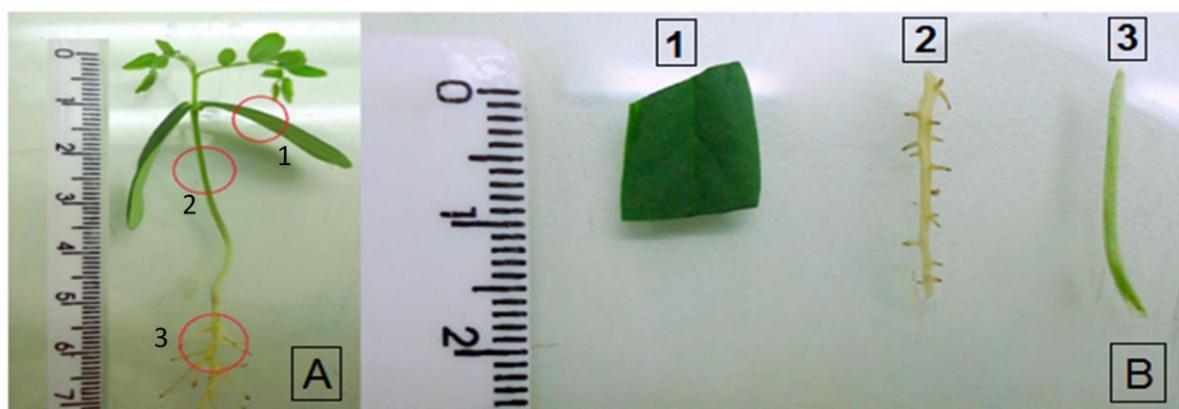


Figura 6 - Fonte de explantes e tipos de explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert utilizados no ensaio de calogênese. A) Planta resultante de germinação *in vitro*, com círculos indicando os explantes e 1B) Segmento cotiledonar; 2B) Segmento radicular e 3B) Hipocótilo. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram

transformadas, sempre que necessário, pela função $\sqrt{x+0,5}$, sendo x o valor observado. Foram realizadas análises de variância e, quando o valor de F foi significativo, utilizou-se para a comparação das médias o teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade de erro, para tratamentos qualitativos, e análise de regressão polinomial, para tratamentos quantitativos. Quando houve interação entre os níveis dos fatores testados, foram realizados os desdobramentos pertinentes. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows®, versão 5.1 (FERREIRA, 2006).

Adicionalmente, quando o valor de F foi significativo, a precisão do ensaio foi calculada por meio da acurácia seletiva (AS). Esta estatística corresponde à correlação linear entre os valores genotípicos e fenotípicos, é estimada por $AS=(1-1/F)^{1/2}$, em que F é o valor do teste F para genótipo (STORCK et al., 2010).

5.5 Resultados e discussão

Em relação às variáveis formação de calos e oxidação fenólica houve interação significativa entre as concentrações de 2,4-D e o tipo de explante e, também, entre o tipo de explante e a presença ou ausência de luz.

Para a porcentagem de calos formados (Figura 7 – A e B), a interação ($p=0,0000$; $AS=0,9384$) entre as concentrações de 2,4-D e o tipo de explante apresentou um ajuste quadrático nos segmentos cotiledonares, sendo que, na presença das duas maiores concentrações testadas (20 μ M e 40 μ M de 2,4-D) foi observado 100 % de calogênese (Figura 8), independentemente da presença ou ausência de luz. Contudo, a Máxima Eficiência Técnica (MET) ocorreria a 27,67 μ M de 2,4-D. Quando foram utilizados hipocótilos, também houve o ajuste a uma equação de segundo grau, com a maior porcentagem de calos (76,6 %) ocorrendo na presença de 20 μ M de 2,4-D, reduzindo-se para 50 % a 40 μ M (Figura 8). A MET foi estimada em 22,63 μ M da auxina. Já nos segmentos radiculares houve um ajuste linear crescente (Figura 8) sendo que, na ausência de 2,4-D, houve apenas 6,6 % de formação de calos, e conforme a concentração do fitorregulador foi aumentando a

porcentagem de formação de calos também aumentou, de maneira que na concentração de 40 μ M de 2,4-D houve 63,2 % de formação de calos.

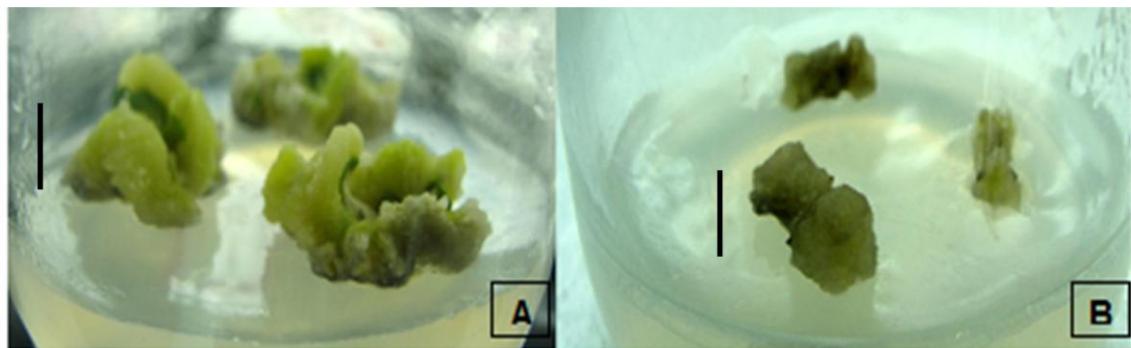


Figura 7 - Calos formados em segmentos cotiledonares (A) e hipocótilos (B) de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), na presença ou ausência de luz. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

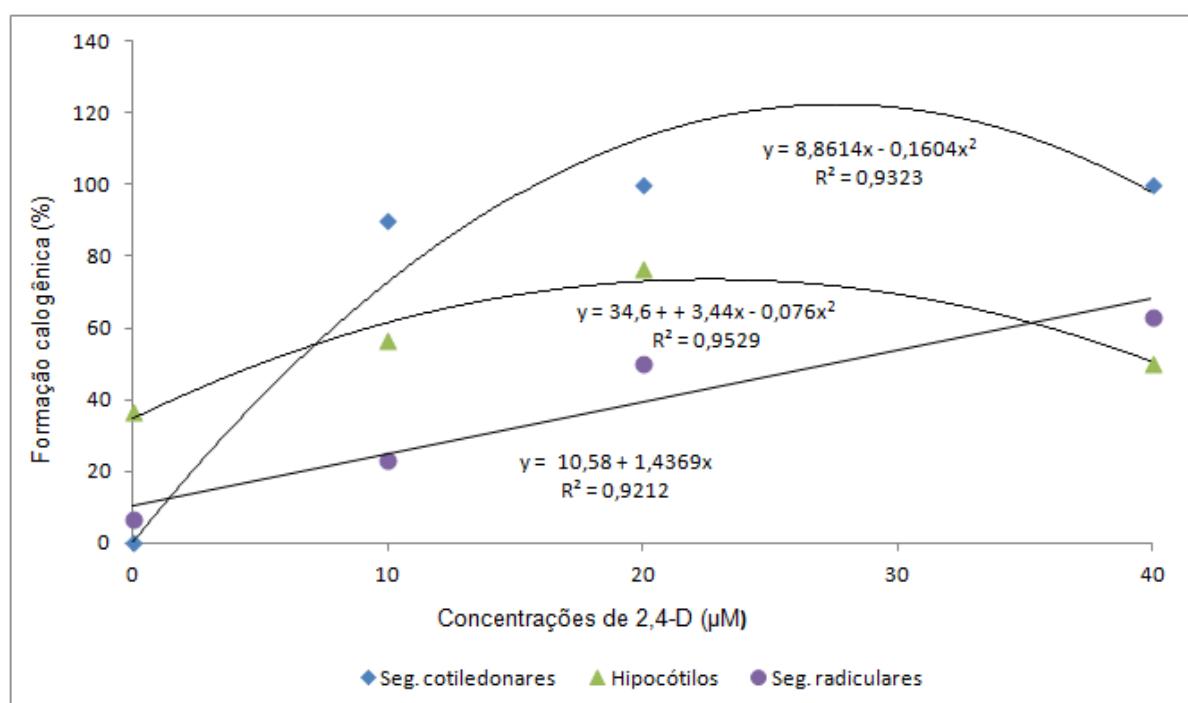


Figura 8 - Porcentagem de formação de calos em diferentes explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), na presença ou ausência de luz. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Estes resultados se devem, provavelmente, do balanço hormonal que se estabeleceu entre os níveis endógenos dos explantes, provenientes de diferentes tecidos, com os níveis de auxina exógena fornecida ao meio nutritivo. Os resultados obtidos para esta variável indicam que há necessidade de adicionar a auxina na indução de calogênese, principalmente em segmentos cotiledonares e radiculares. Nestes explantes, na ausência de 2,4-D a formação de calos foi, respectivamente, nula e reduzida, enquanto nos hipocótilos foi observado um valor próximo a 40% nesta mesma condição. No entanto, os maiores percentuais de calogênese foram observados em segmentos cotiledonares e, depois, em hipocótilos e, em ambos, na concentração 20 μM . Já, os segmentos radiculares apresentaram sua maior calogênese na presença da máxima concentração testada (40 μM), indicando que não são os explantes mais adequados para a indução de calos em *Peltophorum dubium*. Provavelmente, essa resposta seja decorrente da menor capacidade de desdiferenciação dos segmentos de raiz em comparação aos tecidos juvenis da plântula. A AS estimada para a calogênese apresentou um valor elevado, permitindo depositar grande confiança nos resultados obtidos.

Contrastando com o que foi observado no presente ensaio com os hipocótilos, em segmentos de hipocótilos de *Parapiptadenia rigida* (angico-vermelho) cultivados em meio nutritivo WPM (LLOYD; McCOWN, 1981), não foi verificada formação de calos na ausência de fitorregulador e a máxima porcentagem de calos (8,21 %) (KIELSE et al., 2007) formou-se na presença de 4,52 μM de 2,4-D, sendo bastante reduzida em relação à calogênese anteriormente relatada para hipocótilos de *Peltophorum dubium*. Os resultados obtidos com *Parapiptadenia rigida* demonstraram a forte dependência de fonte exógena de fitorreguladores para ativação, desdiferenciação e divisão celular nestes explantes. Em *Bactris gasipaes* (pupunheira), não foi observada calogênese em explantes foliares cultivados em meio nutritivo MS na ausência dos fitorreguladores testados (2,4-D e BAP) e na presença de luz, sendo que a indução de calos aumentou concomitantemente com o aumento nas concentrações de 2,4-D até a concentração de 45,25 μM , decrescendo a partir de então (SANTOS et al., 2012).

Em segmentos apicais e intercotiledonares de *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (paricá) cultivados em meio nutritivo MS (com as concentrações de NH_4NO_3 e Fe-EDTA reduzidas à metade), em que foram avaliadas diferentes concentrações de 2,4-D (a 9,05 μM ; 18,10 μM ou 27,15 μM), na ausência de luz, foi

verificado que houve maior formação de calos nos tratamentos sem adição da auxina, para ambos os explantes utilizados. Entretanto, para segmentos apicais não houve diferença significativa entre o controle (90 %) e os tratamentos com 9,05 μM (71 %) e 18,10 μM de 2,4-D (85 %); e para segmentos intercotiledonares, o controle (95 %) e o tratamento com 9,05 μM de 2,4-D (80 %) não diferiram significativamente entre si (REIS et al., 2007).

Segmentos foliares de *Byrsonima intermedia* (murici-pequeno) cultivados em meio nutritivo MS, apresentaram 90 % de formação de calos na presença de 4,52 μM de 2,4-D e na ausência de luz. Na ausência do fitorregulador, não foi verificada indução de calos, contudo, com o acréscimo de uma pequena concentração do fitorregulador houve uma alta formação de calos (NOGUEIRA et al., 2007).

Em diferentes explantes (segmentos nodais, cotilédones e segmento foliar) de *Peltophorum pterocarpum* (flamboyant amarelo) cultivados em meio nutritivo MS, em diferentes combinações de auxinas (ANA e 2,4-D) e citocininas (BAP e CIN) e na presença de luz, os cotilédones foram os explantes que melhor induziram a formação de calos (93,33 %), assim como ocorreu, no presente ensaio, em *Peltophorum dubium*. No entanto, este resultado de *Peltophorum pterocarpum* foi obtido quando os explantes foram cultivados na presença de 8,89 μM de BAP combinado com 2,69 μM de ANA, enquanto a pior resposta obtida (8,33 %) foi observada na presença de 2,26 μM de 2,4-D (UDDIN et al., 2005). A diferença nos resultados observados nas duas espécies, com a utilização de 2,4-D, sugere que cada espécie responde de maneira específica aos estímulos a que são submetidas.

Ainda em relação à calogênese, também houve efeito significativo para a interação entre o tipo de explante e a presença ou ausência de luz ($p=0,0000$; $AS=0,9670$) (Tabela 10). Na presença de luz, segmentos cotiledonares e hipocótilos foram os explantes que formaram as maiores percentagens de calos, sendo igualmente eficientes. Porém, os segmentos cotiledonares também apresentaram uma elevada calogênese na ausência de luz, cuja média não diferiu daquela observada nestes explantes quando cultivados na presença de luz. Por outro lado, os segmentos radiculares apresentaram a menor calogênese, independente do regime luminoso, comparados aos outros dois explantes. A média de formação de calos em segmentos radiculares foi ainda mais reduzida quando seu cultivo ocorreu na ausência de luz, provavelmente devido ao fato de que algumas espécies

necessitam da presença de luz para que ocorra a maioria dos processos morfogênicos *in vitro*, inclusive a formação de calos (SOUZA; JUNGHANS, 2006).

Tabela 10 - Porcentagem de formação de calos em diferentes explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), na presença ou ausência de luz. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Luminosidade	Formação de calos (%)			
	Seg. cotiledonar	Seg. radicular	Hipocótilo	Média (%)
Presença	75,0 aA ¹	61,6 aB	84,9 aA	73,8
Ausência	70,0 aA	9,9 bB	24,9 bB	34,9
Média (%)	72,5	35,7	54,9	54,4
AS ²		0,9670		

¹Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade de erro. A letra "a" refere-se ao melhor resultado. ²AS = acurácia seletiva, faixas: $\leq 0,5$ = Baixa; $0,5 < AS \leq 0,7$ = Moderada; $0,7 < AS \leq 0,9$ = Alta; $> 0,9$ = Muito Alta.

Em explantes foliares de *Caryocar brasiliense* (pequizeiro) cultivados em meio nutritivo WPM, houve 91,33 % de formação de calos nos explantes que permaneceram na ausência de luz e na presença de 10,74 μ M de ANA combinado com 4,44 μ M de BAP. Esta porcentagem reduziu-se para 58,33 % quando os explantes foram cultivados na presença de luz sob as mesmas concentrações de fitorreguladores citadas anteriormente. Já na ausência de 2,4-D, tanto na ausência quanto na presença de luminosidade, não houve formação de calos (LANDA et al., 2000). Em ápices foliares de *Eucalyptus urophylla* (eucalipto) cultivados em meio nutritivo MS, houve 100 % de formação de calos quando 2,4-D (a 2,26 μ M) foi combinado com ANA (a 0,54 μ M), na ausência de luz (DEUS et al., 2007), mesmo em concentrações mais baixas de fitorreguladores.

Em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (cerejeira) cultivados em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes fitorreguladores (ANA, 2,4-D e BAP,

todos a 5 μM), a ausência de luz foi extremamente favorável à formação de calos (GOLLE, 2010). Os resultados obtidos no presente ensaio, quando comparados com outros estudos, ratificam a observação de que cada espécie responde de maneira distinta aos estímulos a que são submetidas, justificando a necessidade de seleção de protocolos específicos para cada espécie estudada.

Em relação à oxidação fenólica (Figura 9), a interação entre as concentrações de 2,4-D e o tipo de explante ($p=0,0000$; $\text{AS}=0,9575$) apresentou uma AS estimada com um valor elevado, permitindo depositar grande confiança nos resultados obtidos. Para segmentos cotiledonares (Figura 10) houve um ajuste quadrático em função das concentrações testadas. Na ausência do fitorregulador não ocorreu oxidação, contudo, na presença de 20 μM de 2,4-D houve 86,6 %. A MET para oxidação ocorreria a 27,24 μM de 2,4-D, uma concentração próxima, portanto, daquela que foi estimada ser a MET para calogênese. Quanto aos hipocótilos (Figura 10), houve um ajuste linear decrescente em relação às concentrações testadas, sendo que a maior porcentagem de oxidação (93,2 %) ocorreu na ausência de fitorregulador e a menor (59,7 %) – ainda assim elevada - foi observada na presença de 40 μM de 2,4-D. Já nos segmentos radiculares, as médias de oxidação observadas se ajustaram a uma equação de terceiro grau (Figura 10), em que a oxidação máxima (100 %) ocorreu tanto na presença de 20 μM quanto de 40 μM de 2,4-D, assim como também, na ausência da auxina. Na concentração 10 μM , a oxidação reduziu-se para 90 %, mantendo-se, contudo, ainda elevada. Assim, cada tipo de explante respondeu de maneira diferenciada à auxina no que diz respeito à manifestação de oxidação fenólica, evidenciando as particularidades na morfologia de cada tecido em questão. Contudo, considerando-se que segmentos cotiledonares e hipocótilos foram os explantes de *Peltophorum dubium* mais eficientes na indução de calos e, também, que a maior calogênese ocorreu, em ambos, na presença de 20 μM de 2,4-D, fazem-se necessários estudos adicionais para, simultaneamente, maximizar a formação de calos e controlar a oxidação fenólica nestes dois explantes.

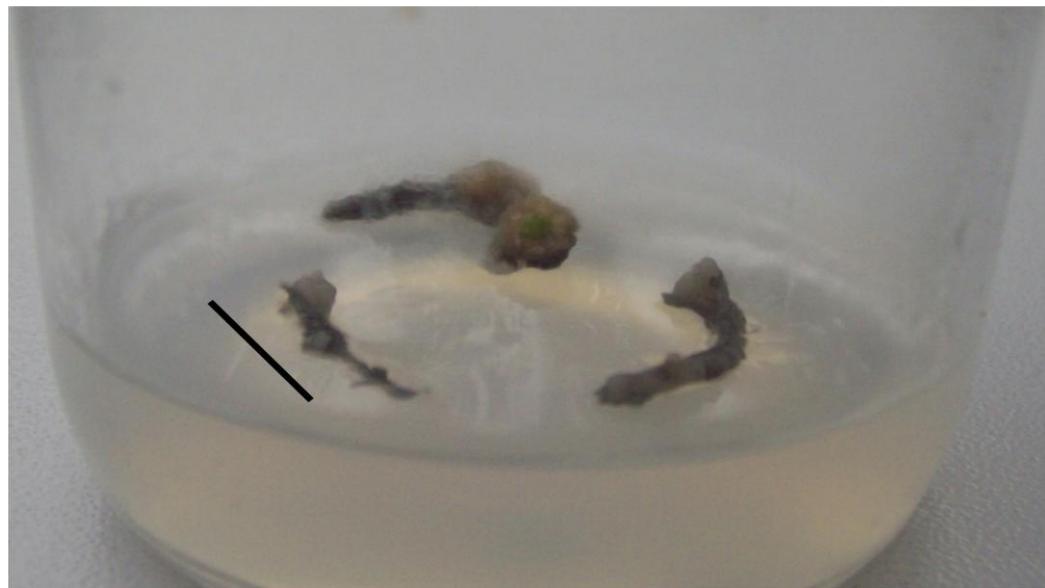


Figura 9 - Segmentos radiculares de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), na presença ou ausência de luz, apresentando oxidação fenólica. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

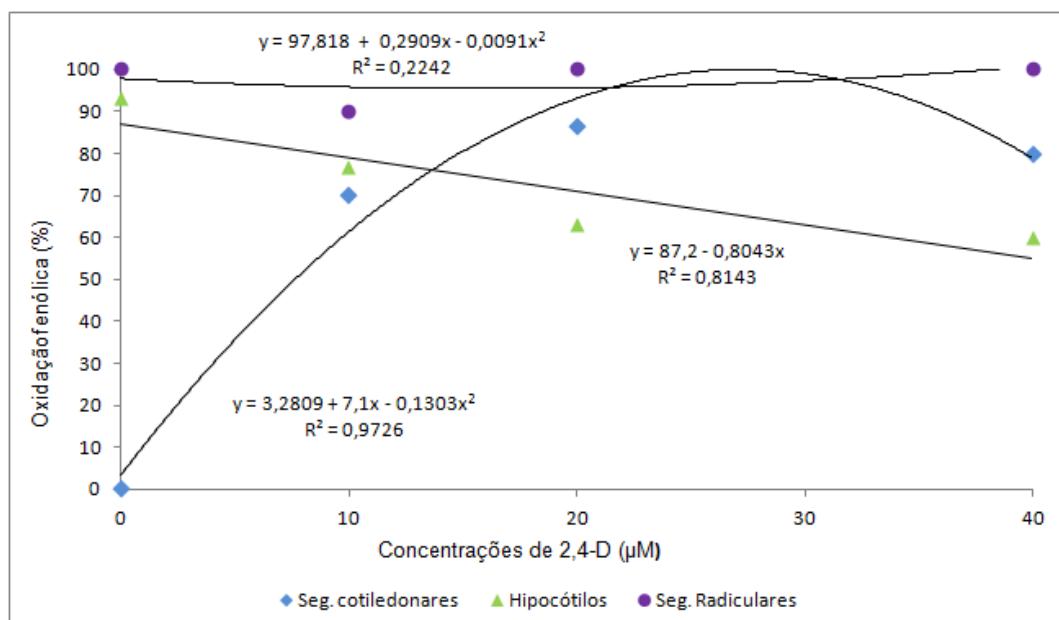


Figura 10 - Porcentagem de oxidação fenólica em explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), na presença ou ausência de luz. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Ainda em relação à oxidação, na interação entre o tipo de explante e a presença ou ausência de luz ($p=0,0001$; $AS=0,9499$) (Tabela 11), a AS estimada, novamente, apresentou um valor elevado, permitindo depositar grande confiança nos resultados obtidos. Observou-se que os segmentos cotiledonares, independente do regime luminoso, e os hipocótilos, na presença de luz, são os explantes que menos oxidam quando comparados aos segmentos radiculares, na presença ou ausência de luz, e aos hipocótilos cultivados no escuro. Entretanto, mesmo assim, as menores médias de oxidação observadas foram superiores a 50 %. Deve-se esclarecer, contudo, que as oxidações observadas não inviabilizaram, de maneira geral, a formação de calos. A oxidação fenólica está relacionada com a ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), que realiza a síntese de compostos fenólicos, sendo que, na presença de luz, a atividade desta enzima é elevada (TAIZ; ZEIGER, 2004). Entretanto, no presente ensaio, com exceção dos hipocótilos, não houve efeito significativo da presença ou ausência de luz sobre a oxidação fenólica, ratificando os resultados obtidos na interação entre os explantes e as concentrações da auxina, em que os diferentes explantes respondem de maneira distinta aos diferentes estímulos.

Tabela 11 - Porcentagem de oxidação fenólica em explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), na presença ou ausência de luz. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Luminosidade	Oxidação fenólica (%)				Média (%)
	Seg. cotiledonar	Seg. radicular	Hipocótilo		
Presença	65,00 aA ¹	95,00 aB	53,05 aA		71,0
Ausência	53,25 aA	100,0 aB	93,20 bB		82,2
Média (%)	59,1		97,5	73,1	54,4
AS ²			0,9499		

¹Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se ao melhor resultado. ²AS = acurácia seletiva, faixas: $\leq 0,5$ = Baixa; $0,5 < AS \leq 0,7$ = Moderada; $0,7 < AS \leq 0,9$ = Alta; $> 0,9$ = Muito Alta.

A oxidação fenólica *in vitro* constitui um dos principais problemas enfrentados durante o cultivo de explantes de plantas lenhosas. Estas espécies são ricas em substâncias derivadas do metabolismo secundário como os polifenóis, que exercem importante papel no seu metabolismo, bem como na defesa contra predadores e microrganismos. Este fenômeno é altamente dependente do genótipo e do tipo de explante utilizados (explantes jovens em geral oxidam menos que os mais velhos) (TEIXEIRA, 2001). Como alternativas a serem estudadas no controle da oxidação fenólica dos explantes podem-se citar: a redução da luminosidade na câmara de fluxo laminar, durante a excisão dos explantes; a manutenção da cultura no escuro no início do cultivo, pois a luz induz à produção de fenóis na planta (MARKS; SIMPSON, 1990); e, também, o emprego de agentes antioxidantes, como polivinilpirrolidona (PVP) e ácido ascórbico, adicionados ao meio nutritivo.

Em discos foliares de *Eugenia involucrata* DC. (cerejeira) cultivados em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes fitorreguladores (ANA, 2,4-D e BAP, todos a 5 µM), houve um aumento significativo das oxidações, na presença de luz, as quais impediram o desenvolvimento dos calos (GOLLE, 2010). Da mesma maneira, em segmentos foliares de *Caryocar brasiliense* Camb (pequizeiro) cultivados em meio nutritivo WPM, suplementado com ANA (a 10,74 µM) combinada com 2,22 e 4,44 µM de BAP, na presença ou ausência de luz, foi observada pequena oxidação nos explantes (LANDA et al., 2000).

Em segmentos apicais caulinares de *Peltophorum dubium* cultivados em meio nutritivo MS em que os explantes foram colocados por sete dias no escuro e posteriormente sob fotoperíodo de 16 h ou expostos diretamente à luz durante todo o experimento, não foi observada oxidação fenólica em nenhum dos tratamentos analisados (BASSAN, 2006). O resultado obtido neste trabalho foi atribuído à reduzida concentração de fenóis ou à origem seminal dos explantes, uma vez que a maioria dos autores considera que a idade do explante está diretamente relacionada à formação dos compostos fenólicos em cultura *in vitro*. Entretanto, deve-se considerar que, no presente ensaio, os explantes utilizados também foram isolados a partir de plântulas e, ainda assim, apresentaram elevada oxidação fenólica.

Em segmentos apicais e intercotiledonares de *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (paricá) cultivados em meio nutritivo MS (com as concentrações de NH_4NO_3 e Fe-EDTA reduzidas à metade), na ausência de luz e combinados com diferentes concentrações de 2,4-D (a 9,05 µM; 18,10 µM ou 27,15 µM), foi verificado

que segmentos intercotiledonares, na presença de 9,05 μM de 2,4-D, apresentaram a maior taxa de oxidação (46,5 %). Contudo, ao se utilizar 27,15 μM de 2,4-D em segmentos apicais não houve a manifestação de oxidação, porém a média obtida não diferiu estatisticamente das outras concentrações utilizadas (9,05 e 18 μM de 2,4-D), e nem de segmentos intercotiledonares expostos à mesma concentração de 2,4-D (6,5%) (REIS et al., 2007).

Em relação aos explantes que formaram raízes (Figura 11 – A, B e C), houve interação tripla significativa entre o tipo de explante, a presença ou ausência de luz e as concentrações de 2,4-D ($p=0,0022$; $\text{AS}=0,8560$) avaliadas. A AS estimada apresentou um valor alto, permitindo depositar confiança nos resultados obtidos.

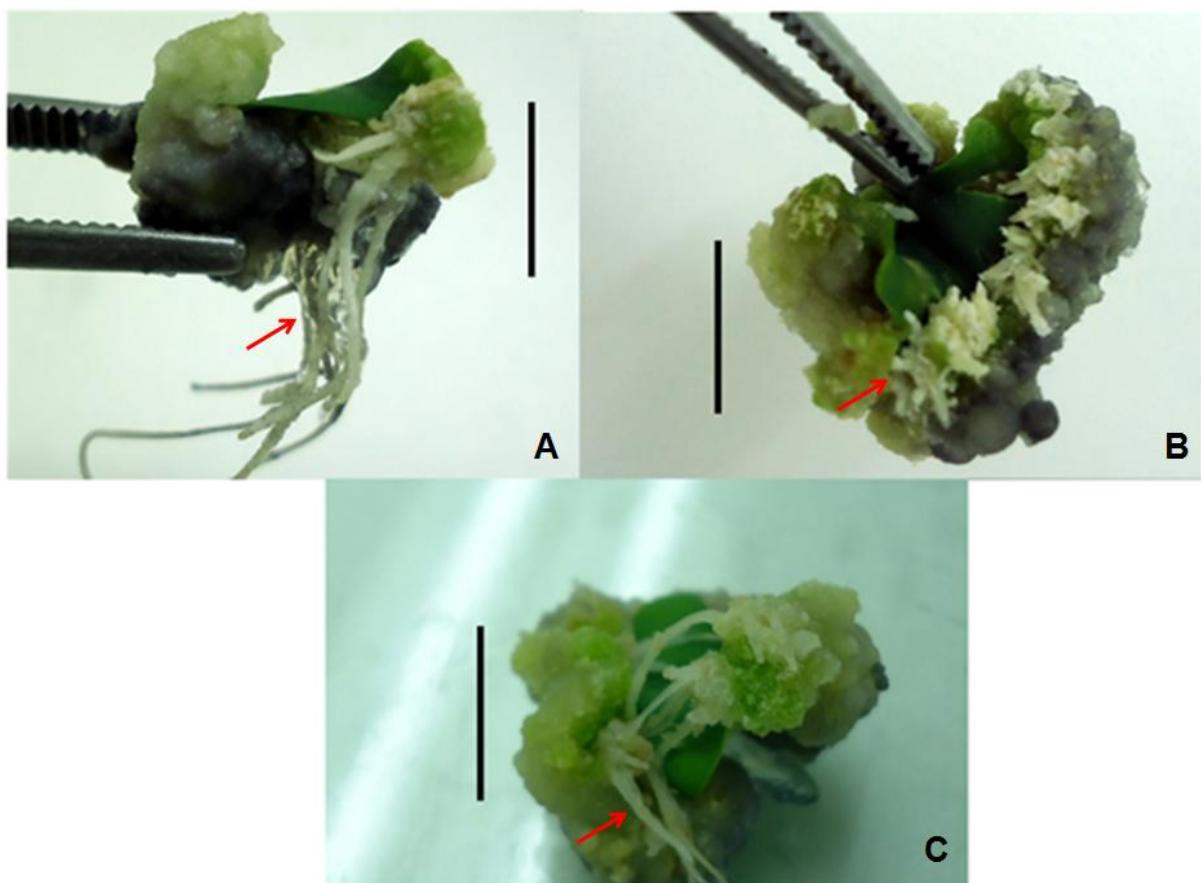


Figura 11 - Raízes formadas em segmentos cotiledonares de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), na presença ou ausência de luz. Barra = 1 cm. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Quanto à presença de luz (Figura 12), houve um ajuste linear crescente em relação às concentrações testadas quando os explantes utilizados foram segmentos cotiledonares (Figura 12), uma vez que não houve formação de raízes na ausência de 2,4-D, contudo, quando foi adicionado ao meio nutritivo MS 40 μM do fitorregulador houve 100 % de formação de raízes, reforçando a teoria referente ao balanço hormonal, em que se espera que concentrações elevadas de auxinas induzam à rizogênese (HINOJOSA, 2000). Quando os explantes utilizados foram hipocótilos (Figura 12), houve um reduzido ajuste a uma curva quadrática em relação às concentrações testadas, sendo que só houve uma pequena formação de raízes na presença de 20 μM de 2,4-D (13,2 %). Igualmente, nos segmentos radiculares (Figura 12), houve um ajuste quadrático em relação às concentrações testadas, porém, ao contrário do que ocorreu com os demais explantes, observaram-se 6,6% de formação de raízes na ausência de 2,4-D e um máximo de 19,8 % a 20 μM da auxina. A MET ocorreria a 20,4 μM de 2,4-D. A diferença no padrão de resultado obtido para esta variável pode ser decorrente das diferenças morfológicas dos explantes, como já mencionado para a formação de calos, assim como também pode estar relacionada ao grau de diferenciação dos explantes (segmentos cotiledonares e hipocótilos versus segmentos radiculares) e à responsividade em função da suplementação com auxina. Deve-se considerar, ainda, que para segmentos radiculares e hipocótilos a porcentagem de oxidação foi elevada (50 a 100 %) já no início do cultivo (dados não apresentados) comprometendo o posterior desenvolvimento do explante, justificando as baixas porcentagens de formação de raízes. No entanto, para os segmentos cotiledonares, em que também foi observada uma alta porcentagem de explantes com oxidação, houve intensa formação de calos e raízes indicando que a oxidação não comprometeu o desenvolvimento dos tecidos do explante. Este resultado pode ser atribuído ao fato de que, neste caso, a oxidação ocorreu, de maneira geral, na borda do explante, restando ainda uma área verde bastante significativa, capaz de responder a estímulos para a organogênese indireta.

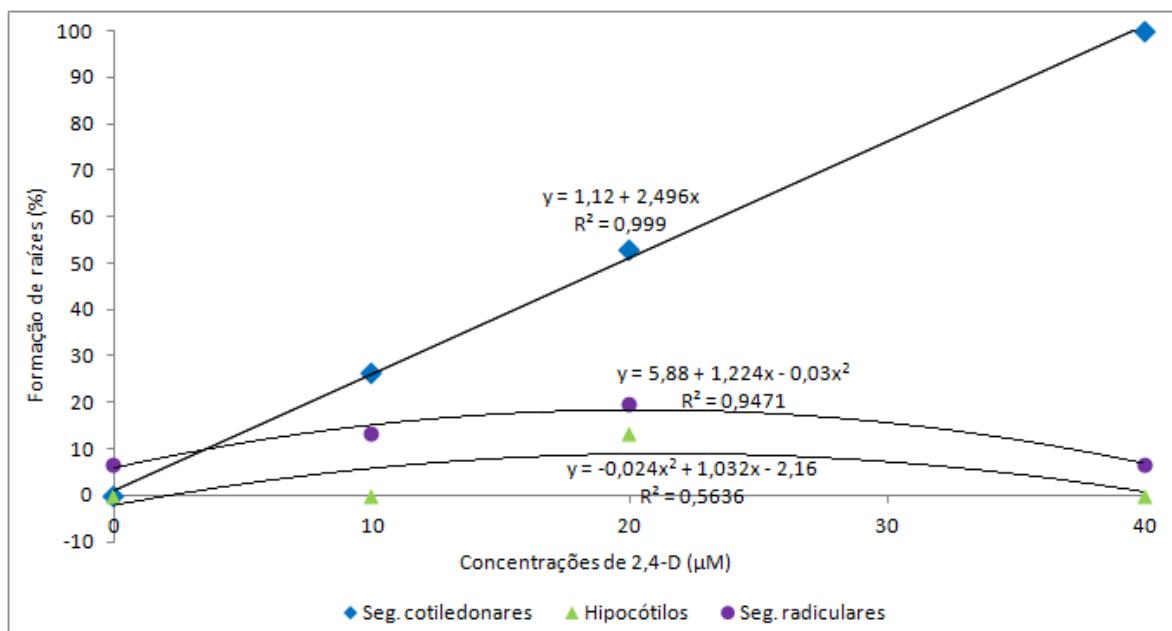


Figura 12 - Formação de raízes (%) em explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), na presença de luz. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

Na ausência de luz (Figura 13), houve um ajuste quadrático em relação às concentrações testadas quando os explantes utilizados foram segmentos cotiledonares (Figura 13), que, assim como ocorreu na presença de luz, não houve formação de raízes na ausência de 2,4-D. Contudo, a maior formação de raízes (93,2%) foi observada na presença de 20 μM de 2,4-D, indicando que a ausência de luz foi favorável, uma vez que permitiu intensa formação de raízes na metade da concentração do fitorregulador que foi necessário para obter resultado semelhante na presença de luz. A MET ocorreria a 26,9 μM do fitorregulador. Quando os explantes utilizados foram hipocótilos (Figura 13) houve um ajuste quadrático em relação às concentrações testadas, em que apenas foi observada formação de raízes (6,6%) quando 20 μM de 2,4-D foram adicionados ao meio nutritivo MS, ratificando o resultado obtido na presença de luz. Quanto aos segmentos radiculares (Figura 13), houve um ajuste quadrático negativo em relação às concentrações testadas e, diferentemente do que foi observado na presença de luz, não ocorreu formação de raízes na concentração 20 μM de 2,4-D. No entanto, na ausência e na presença do fitorregulador a 10 μM formaram-se apenas 6,6% de raízes e, com 40

μM de 2,4-D houve a maior porcentagem de formação de raízes (13,2%), indicando que a ausência de luz não foi favorável para esta variável. A MET ocorreria 16,8 μM de 2,4-D. Igualmente ao resultado observado na presença de luz, os padrões dos resultados obtidos para a ausência de luz podem ser atribuídos às diferenças morfológicas dos explantes.

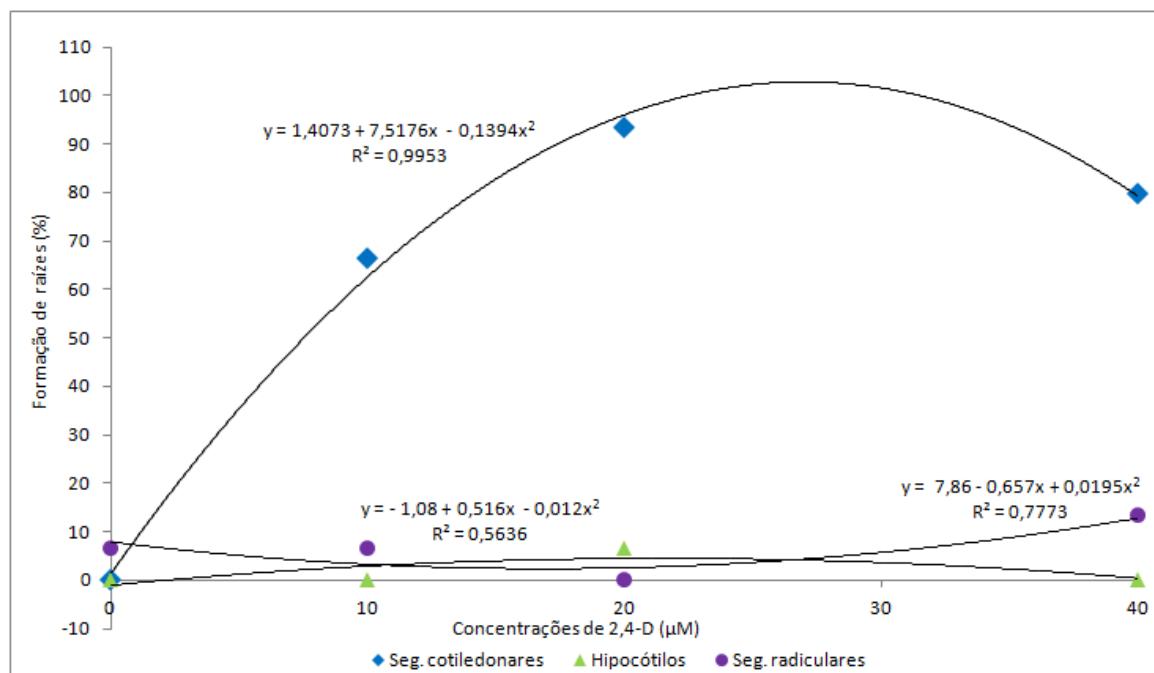


Figura 13 - Formação de raízes (%) em explantes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert, aos 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D), na ausência de luz. Santa Maria, RS, UFSM, 2013.

De maneira geral, pode-se verificar que, nas concentrações de 2,4-D testadas, os explantes respondem melhor à formação de raízes quando na presença de luz, uma vez que na ausência de luminosidade a formação de raízes foi menor. Ainda para esta variável, pode-se inferir que, na presença de luz, os segmentos cotiledonares formam maiores porcentagens de raízes quando submetidos a 40 μM de 2,4-D, enquanto que os segmentos radiculares e hipocótilos respondem melhor à formação de raízes quando cultivados em meio nutritivo suplementado com 20 μM do fitorregulador.

Em explantes foliares de *Caryocar brasiliense* (pequizeiro) cultivados em meio nutritivo WPM suplementado com ANA (a 10,74 μ M) combinado com 2,22 ou 4,44 μ M de BAP, na presença ou ausência de luz, foi observado que a formação de raízes ocorreu somente nos explantes mantidos no escuro (LANDA et al., 2000). Segmentos intercotiledonares de *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (paricá) cultivados em meio MS (com as concentrações de NH_4NO_3 e Fe-EDTA reduzidas à metade), na ausência de luz e sem adição de reguladores de crescimento apresentaram o maior número de raízes (1,51 raízes por explante em média), no entanto não foi observada diferença significativa em relação a segmentos apicais. O menor número de raízes foi verificado em segmentos apicais e intercotiledonares submetidos a 27,15 μ M de 2,4-D. Somente quando foram utilizados 18,10 μ M de 2,4-D foi observada diferença significativa entre as duas fontes de explantes, apresentando, em média, 1,13 raízes por segmento intercotiledonar e 0,82 raízes por segmento apical (REIS et al., 2007).

Em segmentos foliares e internodais de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) cultivados em meio nutritivo MS, na ausência de luz, em que foram testadas diferentes concentrações de ANA (a 13,43 μ M; 26,85 μ M), AIB (a 12,30 μ M; 24,61 μ M) e 2,4-D (a 11,31 μ M; 22,62 μ M) e em que as maiores porcentagens de raízes (95,7 %; 79,9 %; 65,5 % e 60,2 %) foram verificadas em meio desprovido de auxinas, levando a inferir sobre uma possível reserva endógena natural de auxinas nesse tipo de explantes. Além disso, foi constatado que. Das auxinas empregadas, AIB foi aquela que favoreceu o maior desenvolvimento de raízes, principalmente na concentração 12,30 μ M (75,1 %), havendo, ainda, tendência à regeneração direta de plantas em explantes internodais (COSTA et al., 2008).

No presente ensaio, foi observado que os explantes cotiledonares, em sua maioria, formaram calos de coloração verde (dados não apresentados), que são mais propícios à organogênese indireta. Os explantes utilizados a partir de hipocótilos formaram calos de coloração verde clara e, os segmentos radiculares, por sua vez, formaram calos com aspecto oxidado. Quanto à consistência dos calos formados, observou-se, de maneira geral, que eles eram friáveis, quebrando-se facilmente ao toque, o que não é desejável para a formação de órgãos.

Em função do exposto, pode-se considerar que, nas condições avaliadas, o melhor explante para a indução de organogênese indireta em *Peltophorum dubium* é o segmento cotiledonar. Este tipo de explante mostrou-se menos prejudicado pela

oxidação, respondendo de maneira mais satisfatória, uma vez que foram obtidas raízes a partir dos calos, indicando que é possível que ocorra a diferenciação de células de calo em raízes.

5.6 Conclusões

- Independentemente do regime luminoso, segmentos cotiledonares e hipocótilos são os explantes mais adequados à formação de calos.
- A calogênese é maximizada na presença de 20 µM de 2,4-D em segmentos cotiledonares e hipocótilos.
- Na ausência de 2,4-D, os hipocótilos são mais eficientes na calogênese.
- Apesar das altas porcentagens de oxidação fenólica observadas, de maneira geral, as oxidações não inviabilizam a formação de calos, principalmente em segmentos cotiledonares e hipocótilos.

5.7 Referências

COSTA, F. H. da S.; LOUREIRO, T. da S.; PEREIRA, J. E. S. Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 02, p. 269-274, Abr.-/Jun., 2008

DEUS, D. A. de; SOUZA, K. C. A. de; DUARTE, M. S.; PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. de O.; ABREU, H. dos S. Calogênese em *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake em diferentes concentrações de reguladores de crescimento. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 717-719, jul. 2007.

FERREIRA, D. F. **Programa Sisvar: programa de análises estatísticas e planejamento de ensaios.** SISVAR versão 5.1. Lavras: UFLA, 2006. (Software). www.dex.ufla.br/~danielff/softwares.htm

FERREIRA, M. da G. R.; CÁRDENAS, F. E. N.; CARVALHO, C. H. S. de; CARNEIRO, A. A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) em função da concentração de

auxinas e do meio líquido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 23, n. 3, p. 473-476, dezembro 2001.

GOLLE, D. P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese in vitro e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* DC.** 2010. 161 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

HINOJOSA, G. F. Auxinas. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa/Cenargen, 2000. p. 15 - 53.

KIELSE, P. V. do N.; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E.g. Indução de calogênese em explantes de *Parapiptadenia rigida*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 84-86, jul. 2007.

LANDA, F. de S. L.; PAIVA, R. PAIVA, P. D. de O.; FILHO, J. S. de S. B. F. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24 (Edição Especial), p.56-63, dez., 2000.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1992. v. 1, 161 p.
MARK, T. R.; SIMPSON, S. E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **Journal of horticultural science**, Adshford Kent, v. 65, n. 2, p. 103-111, 1990.

MATTEI, V. L.; ROSENTHAL, M., D. Semeadura direta de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. No enriquecimento de capoeiras. **Revista Árvore**, v. 26, n. 6, p. 649-654, 2002.

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

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M. de; SOARES,g. de A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. de O. Indução de calos em explantes foliares de

murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, mar./abr., 2007.

SANTOS, M. R. A. dos; ROCHA, J. F. da; FERREIRA, M. das G. R.; CORREIA, A. de O.; Estabelecimento *in vitro* e calogênese em explantes foliares de pupunheira. **Revista de Ciências Agrárias**, Pernambuco, v. 55, n. 3, p. 197-203, jul./set. 2012.

SINNOTT, E. W. **Plant morphogenesis**. New York: McGraw Hill Book Company, 1960, 560p.

SOUZA, A.S; JUNGHANS, T. G. **Introdução à cultura de tecidos de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa mandioca e fruticultura tropical, 2006. p. 11-37.

STORCK, L. et al. Avaliação da precisão experimental em ensaios de competição de cultivares de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 572-578, maio/jun., 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Brasília: Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001.

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

UDDIN, M. S.; NASIRUJJAMAN, K.; RAHMAN, M. M.; REZA, M. A. Callus induction and indirect regeneration in *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Backer ex K. Heyne. **Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 4, p. 486-489, 2005.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo trouxe importantes contribuições para a compreensão do cultivo *in vitro* de *Peltophorum dubium*. Esclareceu que a multiplicação *in vitro*, dessa espécie florestal, a partir de epicótilos contendo o nó cotiledonar ou de segmentos apicais caulinares e segmentos nodais de origem seminal, em meio nutritivo MS, prescinde do emprego dos fitorreguladores de crescimento avaliados. Também permitiu que se soubesse que a alta senescência foliar observada em alguns estudos anteriormente efetuados pelo grupo de Pesquisa é motivada pela ocorrência de temperaturas elevadas na sala de crescimento e que, mesmo após 35 dias de cultivo *in vitro* em condições de temperatura controlada, a senescência é reduzida.

Dentre os explantes avaliados, os segmentos cotiledonares e os hipocótilos responderam mais favoravelmente à presença de 2,4-D no meio nutritivo MS formando calos. Os segmentos cotidelonares, independentemente da presença ou ausência de luz, e na presença da auxina, destacaram-se na formação de raízes. Contudo, não houve a formação de brotações.

Os resultados obtidos estimulam e justificam a continuação dos estudos relacionados ao cultivo *in vitro* de *Peltophorum dubium*.

REFERÊNCIAS

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

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, p. 37-70, 1990.

CALVETE, E. O; GRANDO, M. F.; GOMIDE, D. G.; MARAN, R. E.; SUZIN, M.; NIENOW, A. A.; CECCHETTI, D. Desempenho *in vitro* e agronômico de cultivares micropropagadas de morangueiro em vários subcultivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 4, p. 943-949, Dezembro 2009.

CAO, J.; JIANG, F.; SODMERGEN; CUI, K. Time-course of programmed cell death during leaf senescence in *Eucommia ulmoides*. **Journal of Plant Research**, Coverage, v. 116, p.7-12, 2003.

CERQUEIRA, E. S. et al. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.2, p.301-8, 2002.

BARRUETO CID, L. P. Citocininas em plantas superiores: síntese e propriedades fisiológicas. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.); LEMUS, E. E. P. [et al.]. **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 58-79, 2005.

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explantes, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 15-43, 2010.

DEUS, D. A. de et al. Calogênese em *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake em diferentes concentrações de reguladores de crescimento. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 717-719, jul. 2007.

DONADIO, N. M. M.; DEMATTÊ, M. E. S. P. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de canafistula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) e jacarandá-da-bama (*Dalbergia nigra* (ver.) fr.ar. exbentb.) - fabaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.22, n.1, p. 64-73, 2000.

DURIGAN, G.; FIGLIOLIA, M. B.; KAWABATA, M.; GARRIDO, M. A. O.; BAITELLO, J. B. **Sementes e mudas de árvores tropicais**. São Paulo: Páginas & Letras, 1997. 65 p.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I. Micropropagação e microestaqueia de eucalipto. In: WENDLING, I.; DUTRA, L. F. (ed.). **Produção de mudas de eucalipto**. Colombo: Embrapa Florestas, 2010, p. 83-120.

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

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A.. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa-CNPH, 1990, p. 99-169.

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

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.; REIS, A.; GRANDO, J. L. Comportamento da canafistula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) em viveiro, submetida a diferentes métodos de quebra de dormência e semeadura. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.5, p.1-18, dez.1982.

GUIMARÃES, C. C. et al. Avaliação da perda da tolerância à dessecação e da quantidade de DNA nuclear em sementes de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert durante e após a germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 33, n. 2, p. 207-215, 2011.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR. F. T. D.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. Prentice-Hall/Englewood Cliffs, New Jersey. 7^a ed. Upper saddle River: Prentice Hall, 2002.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Propagación de plantas**; principios y prácticas. 3. ed. México, Continental, 1967. 693p.

HINOJOSA, G. F. Auxina em plantas superiores: síntese e propriedades fisiológicas. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.); LEMUS, E. E. P. [et al.]. **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 15-57, 2005.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D. A. et al. **Handbook of plant cell culture, techniques for propagation and breedings**. New York: Mac-Millan, v. 1, p. 117-227, 1984.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 352-360, mar./abr., 2010.

LEMOS, E. E. P. de. Organogênese. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 103-127, 2010.

LIM, P. O. et al. Leaf senescence. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 115-136, 2007.

LIM, P. O.; NAM, H. G. Aging and Senescence of the Leaf Organ. **Journal of Plant Biology**, Pavia, v.50, n. 3, p. 291-300, Jun. 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992. 352 p.

LUCCHETTA, L. **Caracterização de melões transgênicos acc oxidase antisense e estudo bioquímico de álcool aciltransferases envolvidas na biossíntese de aromas**. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas: leguminosas**. Santa Maria: UFSM, 1997. 199 p.

MEDEIRO, S. A. **Moduladores da biossíntese e do mecanismo de ação do etileno sobre o crescimento *in vitro* do porta-enxerto de macieira Marubakaido.** 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2001.

MORALES, C. F. G. et al. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 05, n. 03, p. 174-177, 1999.

NOGUEIRA, N. W. et al. Protocolo de desinfestação de *Petiveria alliacea* L. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró-RN. v. 5, n.1, p. 157-161, jan./mar., 2010.

NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, mar./abr., 2007.

OLIVEIRA, A. B.; DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L. Multiplicação e enraizamento *in vitro* do mandacaru (*Cereus jamacaru* p. DC.). **Plant Cell Culture & Micropagation**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 48-54, 2008.

OLIVEIRA, L. M. de et al. Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 1, p. 025-030, abr., 2007.

OLTRAMARI, A. C. et al. Protocolo de micropagação da goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 61-68, 2000.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. de L. Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 23, n. 2, p. 417-420, 2001.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. de L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, 2003.

PESCADOR, R.. et al. Biotecnologia da *Piper hispidinervium* – Pimenta longa. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 15, p. 18-23, 2000.

PINO-NUNES, L. E. **Controle do desenvolvimento vegetal pela interação auxina-citocinina.** Uma nova abordagem baseada no estudo de mutantes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv, Micro-Tom). 141f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2009.

REIS, I. N. R. S. et al. Indução *in vitro* de brotos em paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 21-27, 2008

RIBAS, L. L. F. et al. Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polyneuron*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 115-122.

RIMBAWANTO, A. et al. Micropropagation of *Acacia mangium*. In: RWG1. **Forest Genetics Meeting**, 11, 1991, Coonawarra, Proceedings...Coonawarra, 1991. p. 110-113, 1991.

ROCHA, S. C. da; QUOIRIN, MARGUERITE. Calogênese e rizogênese em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n. 1, p. 91-101.

RODRIGUES, F. R.; ALMEIDA, W. A. B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.12, n.3, p.333-340, 2010.

SALERNO, A. R.; SCHALLENBERGER, T. C. H.; STUKER, H. Quebra da dormência em sementes de Canafístula. **Agropecuária Catarinense**, Chapecó, SC, v.9, n.1, p.9-11, 1996.

SANTIAGO, G. **Variação somaclonal nas cultivares de batata Asterix e Atlantic por marcadores morfológicos e microssatélites.** 167 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; OLIVEIRA, L. M. de. SILVA, D. P. C. da; MARTINOTTO, C.; SOARES, L. P.; PAIVA, P. D. de O. Micropropagação de pequi (Caryocar brasiliense Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 293-296, Agosto, 2006.

SCHIAVINATO, Y. O. et al., Micropropagação de *Anthurium plowmannii* Croat. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 15-20, 2008.

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

VEERASAMY, M.; HE, Y.; HUANG, B. Leaf senescence and protein metabolism in Creeping Bentgrass exposed to heat stress and treated with cytokinins. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 132, n. 4, p. 467–472, 2007.

XAVIER, A.; WENDLIG, I.; SILVA, R. L. da. A Silvicultura clonal. In: XAVIER, A.; WENDLIG, I.; SILVA, R. L. da. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. Viçosa: MG: Ed. UFV, 2009a, p. 13-23.

XAVIER, A.; WENDLIG, I.; SILVA, R. L. da. Biologia da propagação clonal. In: XAVIER, A.; WENDLIG, I.; SILVA, R. L. da. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. Viçosa: MG: Ed. UFV, 2009b, p. 24-58.

XAVIER, A.; WENDLIG, I.; SILVA, R. L. da. Propagação *in vitro* das espécies florestais. In: XAVIER, A.; WENDLIG, I.; SILVA, R. L. da. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. Viçosa: MG: Ed. UFV, 2009c, p. 152-201.

WEDLING, I.; DUTRA, L. F. Micropropagação e microestaqueia de eucalipto. In: DUTRA, L. F.; WEDLING, I. (ed.). **Produção de mudas de eucalipto**. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. p. 83-113.

WINGLER, A. et al. Regulation of Leaf Senescence by Cytokinin, Sugars, and Light: Effects on NADH-Dependent Hydroxypyruvate Reductase. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 116, p. 329–335, 1998.

WINGLER, A. et al. The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, Pavia, v. 57, p. 391-399, 2006.